

Resumos de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado apresentadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de abril a junho de 2012

Biologia Celular e Molecular

EFEITO DA LECTINA ArtinM SOBRE AS CÉLULAS T CD4⁺ MURINAS

Thiago Aparecido da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 05/04/2012

A lectina ArtinM, extraída de sementes de *Artocarpus heterophyllus* e caracterizada como um homotetrâmero constituído de subunidades de 16 kDa, tem alta afinidade de ligação a manitriose Man α 1-3 [Man α 1-6] Man, que constitui o core de *N*-glicanas. ArtinM é dotada de interessantes propriedades biológicas: (1) ativa neutrófilos a partir do reconhecimento de *N*-glicanas dos receptores CXCR2 e TLR2; (2) induz a desgranulação de mastócitos por interagir com *N*-glicanas de Fc R ou com *N*-glicanas de IgE ligadas a Fc ϵ R; (3) estimula a produção de IL-12, por reconhecer *N*-glicanas contidas no ectodomínio de TLR2 da superfície de células apresentadoras de antígeno (APCs); (4) exerce atividade imunomoduladora, que direciona o padrão de resposta para o perfil Th1; (5) confere resistência a infecções por patógenos intracelulares, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*, *Neospora caninum* e *Candida albicans*.

Células T CD4⁺ participam de funções essenciais do sistema imune; durante o estabelecimento de uma resposta imune, podem ser desenvolvidas subpopulações de células T CD4⁺ adequadas para gerar respostas eficientes de combate a patógenos, manutenção da tolerância e regulação da imunidade. A ativação das células T CD4⁺ depende de um primeiro sinal, desencadeado pelo complexo TCR/CD3, e de um segundo sinal, oriundo de moléculas coestimulatórias como CD28. A ativação e expansão de células T CD4⁺ são limitadas pela ação de moléculas inibitórias, principalmente por CTLA-4.

Lectinas podem ativar as células T, sendo a fitohemaglutinina (PHA) e a Concanavalin A (ConA) os exemplos mais conhecidos. Além disso, está bem caracterizado que o alvo de reconhecimento de ConA localiza-se no complexo TCR/CD3.

No presente estudo buscou-se caracterizar os efeitos da lectina ArtinM sobre células T CD4⁺ murinas e investigar os possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos exercidos. Foram avaliados, inicialmente, os efeitos diretos de ArtinM sobre as células T CD4⁺, no que se refere à produção de citocinas, expressão de moléculas coestimulatórias e inibitórias e indução de diferenciação celular. Passou-se então à identificação de possíveis receptores de superfície reconhecidos por ArtinM e responsáveis pelo desencadeamento da ativação celular. Finalmente, buscou-se apontar moléculas sinalizadoras envolvidas nos efeitos diretos de ArtinM.

A primeira evidência da interação direta de ArtinM com células T CD4⁺ foi proporcionada por aglutinação celular. Uma curva dose-resposta revelou que 5 μ g/ml foi a melhor concentração para adquirir significativa produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e Th17 (IL-6 e IL-17A) pelas células T CD4⁺. O estímulo com a concentração ótima de ArtinM mostrou que após 12 horas de incubação houve um significativo aumento nos níveis de IL-2, IFN- γ , IL-6 e IL-17A no sobrenadante celular; persistindo no curso de 48 horas de observação. A secreção concomitante de IFN- γ e IL-17A motivou a avaliação, por citometria de fluxo, da ocorrência de dupla marcação intracelular dessas citocinas. O estímulo, por 24 horas, com ArtinM, levou a importante aumento da frequência de células duplo-positivas para IFN- γ e IL-17.

Uma vez comprovado pelo padrão de citocinas secretadas que ArtinM promove a ativação das células T CD4⁺, investigou-se a expressão das moléculas CD25 e CTLA-4. ArtinM aumentou a expressão de ambas as moléculas, de maneira dose-dependente. Curiosamente, a detecção tanto de CD28, como de CTLA-4, foi precoce e persistente, diferindo do padrão temporal de expressão proporcionado por outros ativadores de células T CD4⁺.

Com vistas a determinar o mecanismo através do qual ArtinM atua nas células T CD4⁺, alvos potenciais de reconhecimento foram ensaiados: CD3 ϵ , CD3 $\epsilon\gamma$, CD28, CD45 e CD4. Esses receptores foram selecionados com base em

predição de potenciais sítios *N*-glicosilados. Dessa forma, anticorpos específicos para essas moléculas foram utilizados para analisar a sua capacidade de inibir a atividade de ArtinM de induzir as células T CD4⁺ a produzir citocinas, como IL-2, IFN- γ , IL-6 e IL-17A. Apenas o anticorpo anti-CD3 $\epsilon\gamma$ foi capaz de impedir a secreção das citocinas induzidas por ArtinM. Além disso, esse anticorpo inibiu a marcação de células T CD4⁺ por ArtinM biotinizada. Esses dados indicam que ArtinM exerce sua atividade sobre células T CD4⁺ através do reconhecimento de glicanas na cadeia γ do receptor CD3, não excluindo-se, entretanto, a ocorrência da interação de ArtinM com outras glicoproteínas na superfície de linfócitos T CD4⁺. Também foi verificado que ArtinM possui alta especificidade por glicanas na superfície dessas células, pois foram necessárias elevadas concentrações de manotriose para inibir em 50% a ligação de ArtinM à superfície das células T CD4⁺.

Através do uso de inibidores específicos para moléculas sinalizadoras, constatou-se que PI3K, PTK, p42/44MAPK, p38MAPK, JNK e PKC estão implicadas na sinalização para a produção das citocinas de perfis Th1 e Th17, induzida por ArtinM.

Esse conjunto de resultados indica que ArtinM é um potente e rápido ativador de células T CD4⁺. A ativação celular induzida por ArtinM está relacionada com a ligação à cadeia γ do receptor CD3 e se associa à alta expressão de moléculas coestimuladoras e inibitórias. Ademais, demonstrou-se que ArtinM promove a diferenciação das células T CD4⁺ naive em células Th1 e Th17, utilizando moléculas sinalizadoras que são conhecidas como críticas para a indução de citocinas que caracterizam essas subpopulações celulares.

NOVOS ASPECTOS DA BIOLOGIA DE NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS POR ArtinM

Rafael Ricci de Azevedo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2012

A lectina ArtinM, obtida das sementes de *Artocarpus heterophyllus*, é alvo de interesse em decorrência de sua importante atividade imunomodulatória, capaz de conferir proteção contra diversos patógenos intracelulares, como *Leishmania major* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

ArtinM atua na imunidade inata a partir de sua interação com glicanos de superfícies celulares. No caso de neutrófilos, liga-se a glicanos associadas a CXCR2 e TLR2, promovendo a fosforilação de tirosina-quinases intracelulares, o "shedding" de L-selectina, a liberação de mediadores inflamatórios e incrementando as funções efetoras dessas células, como a fagocitose e morte de microorganismos. A maioria dos eventos que podem decorrer da ativação de neutrófilos é coberta pelos estudos até então realizados com ArtinM, havendo entretanto uma exceção importante, que se refere ao seu possível efeito sobre o tempo de sobrevivência do neutrófilo e se a interferência gerada pode contribuir ou retardar a resolução de processos infecciosos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência neutrofilica após a ativação por ArtinM, bem como possíveis consequências biológicas desse evento em resposta à infecção por *L. major*.

Numa primeira etapa do trabalho, avaliaram-se, por microscopia óptica e citometria de fluxo, eventos de ativação celular supostamente relacionados com a sobrevivência de neutrófilos. Constatou-se que neutrófilos tratados com ArtinM tiveram aumentada sua capacidade de adesão, já manifesta 3 horas após o estímulo. O tratamento prolongou ainda a expressão de algumas moléculas na superfície dos neutrófilos, como CD16b, CD282, CD11b/Mac1 e CD11c. ArtinM também induziu a desgranulação celular, como demonstrado pela diminuição dos níveis intracelulares de mieloperoxidase, substância sabidamente contida em grânulos primários, formados durante a fase pré-mielocítica.

Numa segunda etapa do trabalho, buscou-se avaliar diretamente como ArtinM influencia a sobrevivência de neutrófilos. Ensaiaados quanto à viabilidade, neutrófilos humanos, obtidos a partir de sangue periférico, sobreviveram em média 24 horas. Entretanto, quando estimulados por ArtinM, eles sobreviveram pelo dobro de tempo. Foi verificado por citometria de fluxo, que o tratamento com ArtinM inibiu tanto a exposição de fosfatidilserina como a quebra de DNA. Análise por microscopia óptica mostrou que neutrófilos não tratados aumentaram a condensação nuclear no decorrer do tempo, enquanto os tratados com ArtinM mantiveram o aspecto original do núcleo. A avaliação da fragmentação de DNA genômico de neutrófilos em gel de agarose, mostrou que o tratamento com ArtinM prolonga a integridade do material genético.

Por fim, buscamos analisar as características assumidas pelos eventos atribuídos à ArtinM quando os neutrófilos são infectados *in vitro* com *L. major*. Por citometria de fluxo, constatamos que neutrófilos tratados com ArtinM, após 3 horas de infecção com *L. major*, tiveram aumentada a frequência de apoptose, em comparação a células não tratadas. Detectou-se ainda, por microscopia óptica, dentre as células tratadas, um maior número de células com parasitos fagocitados.

Os resultados obtidos indicam que o tratamento *in vitro* com ArtinM inibe substancialmente a apoptose espontânea de neutrófilos humanos, associada à desgranulação e expressão persistente de moléculas de superfície, indicadoras de ativação celular. A desgranulação parece desempenhar papel especial na resposta contra patógenos intracelulares, por promover o contato do conteúdo dos grânulos com macrófagos e células dendríticas; assim estimuladas, essas células executam uma resposta efetora. Adicionalmente, concluímos que ArtinM modifica o curso da sobrevivência de neutrófilos infectados com *L. major*, o que pode favorecer a eliminação do patógeno.

VÍRUS OROPOUCHE INATIVADO: ESTUDO DE EFICÁCIA PROTETORA CONTRA DESAFIO EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTER

Alcir Humberto Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Tese de Doutorado apresentada em 28/05/2012

O vírus Oropouche (OROV), da família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu, é a segunda mais frequente arbovirose no Brasil, com mais de 0,5 milhões de casos de doença febril nos últimos 45 anos. OROV causa doença sistêmica com viremia e o vírus pode ser isolado do líquido cefalorraquidiano, mas a patogênese da infecção não foi completamente investigada. Além disso, pouco se sabe sobre a imunogenicidade das infecções naturais por OROV, inclusive se indivíduos infectados desenvolvem imunidade permanente. Utilizou-se um modelo experimental previamente desenvolvido de infecção subcutânea em hamster para avaliar o potencial protetor do OROV inativado com triton e paraformaldeído (OROV_{TP}), ou somente com paraformaldeído (OROV_P), ou com ambos OROV_{TP} (1ª dose) mais OROV_P (2ª dose), ou com luz UV (OROV_{UV}), além de OROV atenuado (OROV_{AT}) propagado por passagens seriadas em células BHK-21. Foi utilizado modelo de desafio por injeção subcutânea em hamster sírio com o vírus neurotrópico (BeAn1991 passado seriadamente em cérebro de camundongos suíços) (OROV_{NEU}). Hamsters recém-nascidos foram imunizados sequencialmente com 50µL de OROV_{TP} e OROV_P, ou com duas doses de OROV_{TP}, ou com duas doses de OROV_P, ou com duas doses de OROV_{UV}, via subcutânea na coxa. A primeira dose foi administrada logo após o nascimento e a segunda após 15 dias, e todos foram desafiados 15 dias após a segunda dose. Hamsters adultos receberam OROV_{AT} (10^{6.5} TCID₅₀/mL) por via subcutânea na coxa duas vezes, com 30 dias de intervalo, e foram desafiados 15 dias após a segunda dose. Animais inoculados com placebo foram utilizados como controle nos experimentos desafio. Realizaram-se testes sorológicos com imunofluorescência indireta e ELISA para avaliar soroconversão, e ensaio de neutralização de efeito citopático. Dos hamsters imunizados sequencialmente com OROV_{TP} e OROV_P, 70% sobreviveram, enquanto que somente 30% dos hamsters do grupo controle sobreviveram. Os animais imunizados com duas doses de OROV_{TP} ou OROV_P não tiveram sobrevivência significativamente maior que os controles. Hamsters imunizados com OROV_{UV} tiveram letalidade cerca de 80% menor do que animais controles, porém sem redução de carga viral ou de anticorpo neutralizantes. OROV_{AT}, usado como controle, induziu alguma proteção com desenvolvimento de anticorpo neutralizante. Nenhuma das preparações de OROV inativado induziu redução de carga viral, nem desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. Os resultados indicam que preparações inativadas de OROV não são imunógenos protetores neste modelo. OROV_{AT} induziu soroconversão com surgimento de anticorpos neutralizantes, abrindo a perspectiva de investigar-se alguma forma segura de atenuação de OROV como candidato vacinal.

Bioquímica

PURIFICAÇÃO DE UMA OXIDASE ALTERNATIVA MITOCONDRIAL RECOMBINANTE DE *Aspergillus fumigatus* EXPRESSA EM *Escherichia coli*

Silveli Suzuki

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/04/2012

Aspergillus fumigatus é uma espécie ubíqua e saprófita, sendo que este desempenha um papel crucial na reciclagem de carbono e nitrogênio no meio ambiente. É um dos principais agentes patogênicos, especialmente entre pacientes imunossuprimidos. Estudos bioquímicos em nosso laboratório sobre a via mitocondrial de *A. fumigatus* confirmaram a presença de uma oxidase alternativa (AOX), a qual é resistente ao cianeto e inibida por ácidos hidroxâmico. O alinhamento das sequências genômica e de cDNA mostrou a presença de dois íntros, sendo que a proteína codificada possui 352

aminoácidos, com massa molecular de 40,80 kDa e pI de 9,95. O RNA total de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para síntese de cDNA e posterior amplificação do gene da AOX, utilizado na clonagem e expressão heteróloga. A verificação da clonagem correta foi realizada pelo sequenciamento. A expressão da AOX recombinante foi realizada em *E. coli* BL21(DE3) e a melhor condição de expressão foi 4 horas de indução à 37°C e IPTG 150 µmol/L. A proteína foi purificada dos corpos de inclusão que foram recuperados a partir de sucessivas lavagens com tampão de lavagem. A purificação da AOX recombinante dos corpos de inclusão foi mediante desnaturação e re-enovelamento da proteína. A proteína recombinante foi analisada por western blot com anticorpo anti-AOX e espectrometria de massas. Os corpos de inclusão foram solubilizados e a proteína desnaturada e re-enovelada sem formação de diferentes isoformas da proteína recombinante. A renaturação da proteína recombinante foi confirmada por cromatografia de exclusão através do método de gel filtração e dicroísmo circular.

AValiação dos Efeitos de Curcumina e MG132 sobre o Parasita *Schistosoma mansoni*

Enyara Rezende Morais

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 05/06/2012

A esquistossomose permanece como grave problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento. Inúmeros relatos mostram o crescente surgimento de linhagens de *Schistosoma mansoni* resistentes ao Praziquantel, droga de escolha para o tratamento da esquistossomose. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas que possam atuar no combate a esta parasitose. O efeito de inibidores do proteossoma tais como o MG-132, tem sido descrito em vários protozoários, seja inibindo o crescimento ou a progressão do ciclo celular, ou bloqueando a replicação. Resultados do nosso laboratório demonstraram que o MG-132 reduziu o número de esquistossômulos na fase pulmonar, a carga parasitária e consequentemente diminuiu a ovoposição em camundongos infectados. A Curcumina, composto fenólico proveniente da planta *Curcuma longa*, tem demonstrado efeito anticancerígeno, anti-inflamatório, antiparasitário, efeito inibitório sobre a atividade do proteossoma, entre outros. Nosso grupo recentemente demonstrou que a Curcumina causa a separação dos casais de vermes adultos de *S. mansoni*, infertilidade dos ovos, diminuição da ovoposição e da viabilidade dos parasitos, levando-os a morte. Diante dessas considerações e sabendo que esses compostos, MG-132 e Curcumina, podem modular a expressão de vários genes, propomos investigar os efeitos destes sobre os vermes adultos de *S. mansoni* através de análises de *microarray*, no intuito de determinar possíveis eventos de sinalização relacionados com o desenvolvimento do parasita e assim, possibilitar a análise de novos alvos moleculares alternativos na terapêutica contra a esquistossomose.

Clínica Cirúrgica

AValiação da Qualidade do Atendimento ao Traumatizado Através do Estudo das Mortes em um Hospital Terciário

Carlos Dario da Silva Costa

Orientador: Prof. Dr. Sandro Scarpelini

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/04/2012

O trauma é causa proeminente de morbidade e mortalidade no Brasil desde a década de 1980, quando então passou a ser considerado importante problema de saúde pública, atingindo proporções epidêmicas. Ele traz consequências sociais de elevado custo por acometer principalmente a população economicamente ativa. O controle de qualidade no atendimento à vítima de trauma e a organização de sistemas de trauma mostraram-se eficazes para a redução de mortes e de complicações evitáveis diminuindo, assim, seu impacto socioeconômico. Mortes evitáveis têm sido usadas como filtro em programas de controle de qualidade e são consideradas marcadores de qualidade global de atendimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de atendimento prestado ao traumatizado em um hospital terciário através da identificação e estudo das mortes evitáveis, potencialmente evitáveis e inevitáveis pela metodologia TRISS (*Trauma Score - Injury Severity Score*) e revisão de prontuários. Tratou-se de um estudo retrospectivo realizado no Hospital de Base de São José do Rio Preto, centro de referência em trauma de uma macrorregião de cerca de 1,5 milhões de habitantes. Foram inicialmente consideradas todas as vítimas de trauma que faleceram no referido hospital entre 1 de junho de 2009 e 31 de maio de 2010, e cujos corpos foram encaminhados ao Instituto Médico Legal (IML) para verificação da causa mortis, em um total de 193

pacientes. Todas as vítimas consideradas "mortas ao chegar", menores de 13 anos, admitidas após mais de 24 horas do trauma, com causa mortis não compatível com trauma, não avaliadas pela Equipe de Trauma na admissão hospitalar ou que não tiveram a ficha de atendimento na emergência localizada foram excluídas do estudo, totalizando 118 pacientes. Setenta e cinco pacientes tiveram seus prontuários revisados e suas probabilidades de sobrevivência (Ps) calculadas. Houve predomínio de mortes em pacientes jovens, do sexo masculino, vítimas de acidentes de trânsito. As médias do RTS (*Revised Trauma Score*), ISS (*Injury Severity Score*) e TRISS foram 5,60, 30,7 e 62,2%, respectivamente. A taxa de mortes consideradas evitáveis foi de 61,3%, potencialmente evitáveis, 24%, e inevitáveis, 14,7%. A amostra do estudo apresentou características epidemiológicas semelhantes às amostras de outros estudos, exceto pela alta taxa de mortes evitáveis. Os altos valores do RTS, influenciados pela intervenção médica efetiva em ambiente pré-hospitalar, foi o que mais interferiu neste resultado. O cálculo do ISS foi prejudicado pela falta de dados em prontuários, dificuldade de acesso e ausência de laudos oficiais de exames de imagem, e pela escassez de detalhes dos laudos do IML. A acessibilidade limitada a estas informações impossibilitou a revisão de prontuários por especialistas dificultando a identificação de erros e oportunidades de melhoria no atendimento. Mudanças como a informatização do prontuário hospitalar, contratação de mais profissionais no setor de radiologia, padronização da coleta de dados e maior integração entre os serviços de atendimento pré-hospitalar e hospitalar foram sugeridas. Novos estudos serão necessários para a avaliação do impacto das mesmas. Palavras-chave: índices de gravidade do trauma, mortalidade, qualidade da assistência à saúde, traumatismo múltiplo.

ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À APOPTOSE NA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA U87-MG COMO FORMA DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO ÁCIDO CAURENÓICO

Fermino Sanches Lizarte Neto

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli

Tese de Doutorado apresentada em 11/05/2012

Objetivos: Gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns e malignos em humanos. Estudos têm demonstrado que diterpenos da classe dos cauranos tem atividade antitumoral via indução de apoptose. Assim, este estudo investigou as respostas celulares ao tratamento com o ácido ent-kaur-16-en-19-oic (ácido caurenóico) na linhagem de células de glioblastoma humano, U87-MG.

Materias e Métodos: Tais respostas foram analisadas em termos de citotoxicidade, indução de apoptose por citometria de fluxo utilizando Anexina V e avaliação da expressão de genes anti-apoptóticos (c-FLIP e microRNA-21) e apoptóticos (Fas, Caspase-3 e Caspase-8) por meio da quantificação relativa dos níveis do mRNA em células U87-MG não tratadas e tratadas com ácido caurenóico (30, 50 and 70 μ M) por 24, 48 e 72 h.

Resultados: Células U87-MG que foram tratadas com o ácido caurenóico demonstraram redução da viabilidade celular e aumento nas células positivas à Anexina V e Anexina V/PI depois de 48 h de tratamento com 70 μ M, demonstrando 26% de taxa de apoptose quando comparado com as células não-tratadas. Similarmente, células U87-MG que foram tratadas com o ácido caurenóico por 48h, apresentaram um aumento na regulação de genes apoptóticos (Caspase-8 e 3) e uma diminuição na regulação de genes anti-apoptóticos (miR-21 e c-FLIP).

Conclusões: Ácido caurenóico possui propriedades interessantes relacionadas ao seu mecanismo indutor de apoptose. Em células U87-MG, o ácido caurenóico tem algum efeito na regulação de genes envolvidos na via extrínseca da apoptose tais como c-FLIP, Caspase-8 e Caspase-3 e miR-21.

EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NA ISQUEMIA AGUDA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS

Luis Gustavo Campos da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2012

Contexto: A depleção de oxigênio nos tecidos constitui uma das bases da isquemia. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é uma modalidade terapêutica que visa aumentar o fornecimento de oxigênio sob pressões maiores que as da atmosfera. Os efeitos desta terapia na isquemia de músculo esquelético não estão esclarecidos.

Objetivo: Demonstrar os efeitos da OHB em músculo esquelético de ratos submetidos à isquemia total com duração de 4 horas e 30 minutos, analisando-se as enzimas musculares (aspartato aminotransferase - AST, dehidrogenase láctica -

DHL e creatina fosfoquinase - CPK), um produto de degradação de membrana celular (malondialdeído - MDA), o consumo energético (glicogênio tecidual) e a albumina modificada pela isquemia (AMI).

Material e Método: Foram estudados 48 ratos da linhagem Wistar distribuídos em 4 grupos com 12 animais cada e submetidos a 4 h e 30 min de isquemia total pelo método do torniquete do membro pélvico esquerdo, exceto o grupo controle. Os ratos foram anestesiados e assim distribuídos: o primeiro grupo OHB recebeu tratamento com OHB nos 90 primeiros minutos durante a isquemia do membro; o segundo grupo POHB foi submetido a 90 min de OHB imediatamente antes das 4h30min de isquemia; o terceiro grupo Isquemia (I) teve apenas o membro garroteado por 4h e 30min e o quarto grupo Controle (C) foi apenas submetido à coleta de amostras após 4h e 30min. Coletou-se 3ml de sangue da veia cava inferior ao final da isquemia para as dosagens de AST, DHL, CPK e AMI. Colheu-se também, biópsia do músculo gastrocnêmio (membro pélvico esquerdo) para dosagem tecidual de MDA e glicogênio muscular.

Resultados: Houve aumento significativo da AST e CPK em todos os grupos em que houve isquemia, em relação ao controle. Não houve diferença dos valores de CPK entre os grupos controle e POHB. No entanto, POHB também não diferiu do grupo Isquemia. Os valores da DHL e da AMI foram semelhantes entre os grupos. A análise do glicogênio muscular evidenciou acentuado consumo energético nos grupos submetidos à isquemia. Demonstrou-se maior lesão na membrana celular por peroxidação lipídica (MDA) no grupo POHB, em relação ao grupo OHB.

Conclusão: Concluiu-se que a OHB aplicada previamente à instalação da isquemia aguda em músculo esquelético de ratos submetidos à isquemia total de 4 horas e 30 minutos, agrava a lesão muscular, caracterizada pelo aumento na peroxidação lipídica. A OHB não promove atenuação da lesão isquêmica neste modelo, baseando-se na avaliação das enzimas musculares, peroxidação lipídica, glicogênio muscular e albumina modificada pela isquemia.

ESTUDO DO NITRITO/NITRATO NO CONDENSADO DO EXALADO PULMONAR E NO PLASMA DE PACIENTES VALVOPATAS E CORONARIOPATAS SUBMETIDOS À CIRURGIA CARDÍACA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA

Livia Arcêncio

Orientador: Prof. Dr. Alfredo José Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/05/2012

Pacientes submetidos à cirurgia cardiotorácica com circulação extracorpórea (CEC) apresentam reações inflamatórias, desencadeadas por este procedimento e pela isquemiareperfusão, que acarretam disfunção pulmonar e lesão do endotélio vascular no pósoperatório. Estes processos relativos à cirurgia cardíaca podem afetar a produção e o consumo do óxido nítrico (NO) no pulmão e no endotélio vascular, principalmente na sua participação no processo inflamatório. No pulmão, o NO se difunde com facilidade sendo detectado na via aérea na fase gasosa ou no fluído pulmonar como nitrito e o nitrato. A presença do NO na via aérea pode em algumas situações refletir a sua produção pelo epitélio da via aérea e pelo endotélio microvascular pulmonar. No entanto, os processos que envolvem a produção e o consumo do NO na via aérea ainda não estão totalmente esclarecidos. O condensado do exalado pulmonar (CEP) é um fluido obtido através do resfriamento do ar exalado através de um método totalmente não invasivo e que pode ser utilizado para a investigação do NO nas vias aéreas distais. No desenvolvimento deste estudo foi utilizado um aparato de coleta artesanal e de baixo custo para obtenção do CEP. Assim, foi coletado o CEP de pacientes coronariopatas e valvopatas submetidos à cirurgia cardíaca com CEC nos períodos préoperatório e pós-operatório (4 horas após a CEC e 12, 24, 48 e 72 horas após a extubação). As concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato destes pacientes também foram avaliadas através de amostras de sangue colhidas imediatamente após cada coleta do CEP. O CEP e o plasma foram analisados pela técnica de quimioluminescência para obter as concentrações de nitrito/nitrato. O aparato utilizado obteve utilização reprodutível na rotina clínica da cirurgia cardíaca nesta pesquisa em pacientes sob ventilação espontânea e ventilação mecânica. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações de nitrito/nitrato no CEP e plasma entre os pacientes coronariopatas e valvopatas no período pré-operatório. Concentrações significativamente maiores de nitrito/nitrato ($p = 0,017$) foram encontradas no CEP, mas não no plasma, de pacientes que utilizaram nitrato por via oral (dinitrato de isossorbida) no período pré-operatório. Em pacientes que não utilizaram medicação contendo doador de NO (nitroglicerina ou nitroprussiato de sódio) por via endovenosa no pósoperatório ocorreu uma tendência à elevação das concentrações de nitrito/nitrato no CEP que foi numericamente significativa no período de 48 horas do pós-operatório ($p = 0,008$). Em pacientes que receberam ou não doador de NO no pós-operatório as concentrações de nitrito/nitrato foram significativamente maiores nos períodos de 48 horas ($p = 0,005$) e 72 horas ($p = 0,037$) do pós-operatório. A utilização de nitroglicerina (NTG) no período pós-operatório elevou significativamente as concentrações de nitrito/nitrato no CEP nos períodos de 12 horas ($p = 0,022$), 48 horas ($p = 0,015$) e 72 horas ($p = 0,048$) e no plasma nos períodos de 12 horas ($p = 0,045$). As concentrações de nitrito/nitrato

plasmáticos foram significativamente reduzidas ($p=0,045$) no pós-operatório imediato 4 horas após a CEC em pacientes que receberam ou não doador de NO. A partir destes resultados pode se observar que não houve diferenças significativas nas concentrações de nitrito/nitrato no CEP dos pacientes coronariopatas e valvopatas no período pré-operatório, exceto elevação significativa encontrada em pacientes que utilizaram dinitrato de isossorbida por via oral. As concentrações de nitrito/nitrato no CEP tendem a elevar-se no período pós-operatório principalmente com a utilização de NTG. As concentrações de nitrito/nitrato no plasma foram significativamente reduzidas após 4 horas da CEC no pós-operatório imediato. No entanto foi observado elevação nas concentrações de nitrito/nitrato no plasma de pacientes que usaram NTG. Os achados deste estudo poderão contribuir em futuras pesquisas fornecendo dados comparativos a respeito da participação do NO na via aérea e no plasma nos processos que envolvem a cirurgia cardíaca nos períodos pré e pós-operatório.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DA APOPTOSE NA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EM RATOS POR COLORAÇÃO LUXOL FAST BLUE E POR TUNEL

Giusepe Picone Junior

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2012

Introdução: A isquemia cerebral constitui uma das patologias com maior repercussão para a saúde pública devido a seu impacto sócio-econômico. Experimentos utilizando modelos animais de isquemia cerebral têm auxiliado na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da morte neuronal. De especial interesse, vem se destacando a morte neuronal por apoptose, por se tratar de mecanismo complexo, formando uma cascata bioquímica que, potencialmente, pode ser bloqueada, permitindo preservação de neurônios na área isquêmica. Portanto, é de grande importância tentar se definir melhor a distribuição da apoptose na área de isquemia.

Objetivo: Avaliar a área isquêmica através do emprego do TTC, as alterações histopatológicas encontradas por coloração com Luxol Fast Blue na microscopia de luz (ML) e a distribuição da apoptose neuronal com emprego de TUNEL.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 60 ratos machos adultos da linhagem Wistar, divididos em três grupos: Controle (C), Sham (S) e Isquêmico (I). O grupo C, constituído por 20 animais, dos quais 10 submetidos ao TTC, 10 para a ML e para o TUNEL; o grupo S, por 20 animais, dos quais, 10 para o TTC, 10 para a ML e para o TUNEL; o grupo I por 20 animais, 10 para o TTC, e 10 para a ML e para o TUNEL. Os animais do grupo isquêmico foram submetidos à isquemia, durante 90 min, por oclusão da ACM com fio intra-luminal, seguida de reperfusão de 48h. Os encéfalos foram retirados, cortados em plano coronal e submetidos a coloração com TTC ou Luxol Fast Blue e TUNEL. Os cortes corados com TTC foram fotografados, as áreas da isquemia e do HCE medidas, obtendo-se as porcentagens de área isquêmica nestes animais. Os cortes corados com Luxol Fast Blue foram avaliados descrevendo-se os achados histopatológicos em três áreas do HCE (denominadas área 1 - córtex dorsolateral, área 2 - córtex lateral, e área 3 - striatum). Os cortes corados com emprego do TUNEL foram submetidos a contagem dos neurônios totais e dos em apoptose em dois campos de maior marcação (hot spot) em cada área (1, 2 e 3), obtendo-se a porcentagem de marcação nestas áreas.

Resultados: As áreas de isquemia avaliadas pelo TTC ocorreram em 80% dos animais do grupo I; as alterações histológicas encontradas foram concordantes com a literatura; foram encontradas células TUNEL-positivas em maior proporção nas áreas 1 e 3 ($p < 0,05$, KRUSKAL-WALLIS), mas estavam presentes também nas outras áreas.

Conclusão: os dados permitem afirmar que a apoptose participa da morte neuronal na isquemia focal e que é mais frequente na área que corresponde à área de penumbra, mas está presente em toda a área de isquemia.

ANÁLISE DOS MICRORNAS: 15, 16, 21, 221 E 222 COMO MARCADORES MOLECULARES NO SANGUE DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL ASSOCIADA OU NÃO AO ALCOOLISMO

Paulo Cesar Novais

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli

Tese de Doutorado apresentada em 28/05/2012

Introdução: A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte e deficiência neurológica em muitos países. Trata-se de uma condição frequente na prática clínica que oferece difícil solução terapêutica, pois seu estudo fisiopatológico, entre outros aspectos, é dificultado pela grande diversidade na sua localização anatômica, na sua etiologia e nas suas manifestações clínicas. Associado a este fato e sabendo que o alcoolismo é um dos principais problemas de saúde, social e econômico em muitas sociedades, são necessários maiores estudos sobre os seus efeitos e problemas relatados, asso-

ciado ou não ao processo de isquemia cerebral. É sabido que os neurônios são susceptíveis à morte após isquemia cerebral global transitória e o que o infarto decorrente desta isquemia tem sido demonstrado em vários estudos. No entanto, o mecanismo responsável pelo infarto tardio não está claramente descrito. Embora alguns pesquisadores sugiram que a apoptose seja o principal mecanismo fisiopatológico, continua controverso se a apoptose ou a necrose estão envolvidos na morte neuronal tardia.

Objetivos: Avaliar a expressão gênica no sangue dos miRNAs-15b e 16 (apoptóticos) e dos miRNAs-21, -221 e -222 (anti-apoptóticos), após indução experimental de isquemia cerebral focal temporária (90 minutos) por obstrução da artéria cerebral média e após reperfusão de 48 horas, associada ou não a um modelo de alcoolismo crônico.

Material e métodos: Foram utilizados 56 ratos Wistar adultos, subdivididos em 7 grupos experimentais: grupo controle (C): animais submetidos apenas à anestesia; grupo sham (S): animais submetidos à simulação completa do procedimento cirúrgico; grupo isquêmico (I): animais submetidos à isquemia cerebral focal por 90 minutos; grupo isquêmico com reperfusão (IR): animais submetidos à isquemia cerebral focal por 90 minutos seguido por reperfusão de 48 horas; grupo alcoolizado (A): animais que receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água durante quatro semanas; grupo isquêmico e alcoolizado (I+A): animais submetidos ao mesmo tratamento do grupo A e que, após quatro semanas foram submetidos à isquemia cerebral focal durante 90 minutos; e, grupo isquêmico com reperfusão e alcoolizado (IR+A): animais submetidos ao mesmo tratamento do grupo A e que, após quatro semanas foram submetidos à isquemia cerebral focal durante 90 minutos, seguido por reperfusão de 48 horas. As amostras do encéfalo coletadas foram processadas para a análise histopatológica (confirmação das lesões causadas pela isquemia) pela técnica de luxol fast blue; e o sangue da artéria ventral da cauda foi coletado para a análise da expressão gênica sérica de alguns miRNAs apoptóticos e anti-apoptóticos, pela técnica de PCR em tempo real.

Resultados: A expressão do miRNA-16 (apoptótico) no sangue mostrou ser maior nos grupos I e principalmente IR, em relação aos grupos C e S ($p < 0,05$); porém, sem associação com o alcoolismo crônico. A expressão sérica dos miRNAs antiapoptóticos (-21, -221 e -222) foi baixa em todos os grupos e sem correlação entre a lesão isquêmica e/ou associada ao alcoolismo crônico, embora para o miRNA-222 estivesse maior nos animais dos grupos A e I+A.

Conclusões: Apenas para o miRNA-16 parece ter participação ativa no mecanismo de apoptose desencadeado pela isquemia, o que o coloca como um possível candidato a marcador molecular sérico envolvido na patogênese da isquemia cerebral.

EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR SOBRE A REATIVIDADE DA AORTA TORÁCICA DE RATOS

Verena Kise Capellini

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bsarbosa Evora

Tese de Doutorado apresentada em 12/06/2012

Introdução: a acidose metabólica, comum nos quadros de diabetes mellitus e disfunção renal, desencadeia uma série de alterações no funcionamento do organismo, dentre elas, a alteração do tônus vascular.

Objetivos: investigar os efeitos da acidificação extracelular sobre a reatividade da aorta torácica de ratos, bem como os mecanismos celulares envolvidos nesta resposta.

Metodologia: ratos Wistar machos foram anestesiados e a aorta torácica foi coletada para os estudos de reatividade vascular, citometria de fluxo e microscopia confocal. A acidificação extracelular foi induzida pela adição de ácido clorídrico às soluções. A tensão isométrica foi mensurada simultaneamente à medida do pH extracelular. Foram realizadas curvas pH-resposta (7,4 a 6,5) em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com cloreto de potássio e fenilefrina, na ausência e na presença de indometacina, N-nitro-L-arginina-metilester, apamina, paxilina e glibenclamida. Células endoteliais isoladas e cortes de aorta, carregados com as sondas fluorescentes 5-(and-6)-carboxy seminaphthorhodafluor-1, acetoxymethyl ester, acetate e diaminofluorescein-FM diacetate, foram estimulados com soluções ácidas (pH 7,0 e 6,5) e avaliados, por citometria de fluxo e microscopia confocal, para mensuração do pH intracelular e da concentração intracelular de óxido nítrico, respectivamente.

Resultados: a acidificação extracelular não alterou o tônus de anéis de aorta sob tensão basal ou pré-contraídos com cloreto de potássio, porém induziu relaxamento, dependente do pH, em anéis de aorta com e sem endotélio pré-contraídos com fenilefrina. O relaxamento, induzido por acidificação extracelular, foi inibido em diferentes magnitudes por indometacina, N-nitro-L-argininametilester, apamina, paxilina e glibenclamida. A acidificação extracelular não alterou o pH intracelular de células endoteliais. O pH extracelular 7,0 reduziu o pH intracelular de células musculares lisas. O pH

extracelular 6,5 não alterou o pH intracelular de células musculares lisas. A redução do pH extracelular aumentou a concentração intracelular de óxido nítrico tanto nas células endoteliais quanto nas musculares lisas. Conclusões: em aorta torácica de ratos, a acidificação extracelular, por ácido clorídrico, promove vasodilatação parcialmente dependente do endotélio e mediada por prostaciclina, óxido nítrico e ativação de canais para potássio ativados por cálcio de baixa e alta condutância e canais para potássio dependentes de trifosfato de adenosina. Quando esta acidificação é moderada (pH 7,0) o pH intracelular de células musculares lisas reduz, mas retorna aos valores basais quando a acidificação extracelular é extrema (pH 6,5). Além disso, a redução do pH extracelular não altera o pH intracelular de células endoteliais e aumenta a concentração intracelular de óxido nítrico tanto nas células endoteliais quanto nas musculares lisas.

PERFIL DE EXPRESSÃO DE CASPASE 3, BCL 2, MIR-15B, MIR-16 E MIR-21 EM RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL E AÇÃO NEUROPROTETORA DA HIPOTERMIA

Kassia Karoline Rosa do Valle

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/06/2012

Introdução: A isquemia cerebral é uma das doenças que mais comprometem a espécie humana, conduz à privação de oxigênio e pode gerar seqüelas aos pacientes.

Objetivo: A partir de um modelo experimental em ratos submetidos à isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média com um fio intraluminal, foram objetivos deste trabalho a determinação do perfil da expressão dos microRNAs pró-apoptóticos miR-15, miR-16 e anti-apoptótico miR-21 e dos genes pró-apoptótico CASPASE 3 e anti-apoptótico BCL 2 através de PCR em tempo real, bem como avaliar a correlação entre a expressão destes miRNAs com a expressão gênica. Também foi avaliado o efeito neuroprotetor da hipotermia.

Material e Métodos: Foram utilizados 60 ratos Wistar adultos, divididos em sete grupos experimentais aleatórios, cada um de 10 animais sendo o período de isquemia padronizado em 60 minutos: grupo controle (C); grupo sham (S); grupo isquêmico (I); grupo isquêmico com hipotermia (I+H); grupo isquêmico com reperfusão de 48 horas (I+R); grupo isquêmico com reperfusão de 48 horas em associação com hipotermia (I+H+R). Foi coletado material para análise em PCR em tempo real (sangue e tecido).

Resultados: O grupo I+H apresentou maior expressão do miR-21 no sangue em relação ao grupo controle. Não houve correlação entre a expressão dos microRNAs com os genes estudados, e também não foi encontrada alteração significativa na expressão gênica nos grupos estudados.

Conclusões: Nossos resultados sugerem que a hipotermia pode levar a neuroproteção, porém mais estudos se fazem necessários, bem como sobre o uso do sangue para identificação de novos microRNAs como biomarcadores.

Clínica Médica

TESTE ERGOESPIROMÉTRICO MÁXIMO EM CICLOERGÔMETRO. ESTUDO DA RESPOSTA DOS PARÂMETROS DE TRANSPORTE DE OXIGÊNIO EM RELAÇÃO À RAMPA DE POTÊNCIA APLICADA EM PESSOAS SAUDÁVEIS E CORONARIOPATAS

Daniela Caetano Costas

Orientador: Prof. Dr. André Schmidt

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/04/2012

O Teste Ergoespirométrico (TEE) tem mudado profundamente a abordagem da avaliação funcional, relacionando aptidão física e parâmetros fisiológicos ao substrato metabólico subjacente, e fornecendo descritores de capacidade de esforço altamente reprodutíveis. A elaboração de uma fórmula para cálculo do incremento de carga em um TEE incremental do tipo rampa por Wasserman e colaboradores representou um grande auxílio na escolha da intensidade mais adequada para otimizar a qualidade do teste e respeitar a recomendação de tempo de duração do teste (10 ± 2 minutos). Em muitos casos, apenas a estimativa do incremento de potência pela fórmula, baseada em características antropométricas e direcionada a indivíduos saudáveis sedentários, acaba subestimando ou superestimando a real capacidade funcional do indivi-

duo ou paciente. Características marcantes do estado de saúde (boa aptidão física, atleta, treinados), assim como do estado de doença (insuficiência cardíaca crônica, infarto do miocárdio, doença arterial coronária) interferem diretamente no desempenho e homeostase dos sistemas pulmonar, cardiovascular e músculo-esquelético.

Objetivo: Os objetivos desse trabalho foram investigar o comportamento das variáveis ventilatórias e suas correlações nas distintas fases de um protocolo de esforço incremental do tipo rampa, em indivíduos saudáveis e coronariopatas, frente a um TEE e, analisar a concordância entre as medidas reais obtidas pelo TEE e os valores previstos pela equação de Wasserman em ambos os grupos. Além disso, caso ocorressem diferenças entre essas medidas, determinar o quanto afetam as diferenças da rampa de potência aplicada.

Métodos: Foram recrutados 28 indivíduos do sexo masculino, sendo 16 coronariopatas, idade média 57 ± 8 anos e 12 saudáveis, idade média 47 ± 4 anos. Ambos grupos realizaram um TEE em cicloergômetro, com protocolo do tipo rampa e intensidade calculada segundo a equação de Wasserman. Todos foram incentivados a alcançar o limite máximo de tolerância ao esforço.

Resultados e Conclusão: Basicamente, a fórmula de Wasserman não se aplica de forma adequada para prever a capacidade funcional dos voluntários brasileiros estudados, sejam eles saudáveis ou coronariopatas, e assim não prevê precisamente o incremento de potência (rampa) nos TEE incrementais em cicloergômetro. Quando comparamos saudáveis e coronariopatas, a discordância entre as medidas foi muito mais acentuada na amostra coronariopata. Avaliando as variáveis de transporte de oxigênio em repouso e em esforço submáximo e máximo, pudemos observar que o grupo coronariopata apresentou menores valores de FC, VO_2 , potência e V ($\text{FC}_{\text{repouso}}$: 57 ± 7 bpm para GC e 77 ± 14 bpm para GS; $\text{VO}_{2\text{repouso}}$: $209,47 \pm 34,10$ ml/min para GC e $259,69 \pm 42,25$ ml/min para GS; $\text{FC}(\text{LA})$: 78 ± 15 bpm para GC e 103 ± 13 para GS; $\text{VO}_2(\text{LA})$: $739,75 \pm 128,42$ ml/min para GC e $943,45 \pm 191,68$ ml/min para GS; $\text{FC}(\text{pico})$: 117 ± 17 bpm para GC e 164 ± 12 bpm para GS; $\text{VO}_2(\text{pico})_{\text{real}}$: $1327,2 \pm 287,15$ ml/min para GC e $2110 \pm 335,83$ ml/min para GS). Essa redução pôde ser explicada, parcialmente, pelo uso do agente farmacológico β bloqueador. A análise de correlação das variáveis obtidas no TEE demonstrou que o efeito cronotrópico negativo é mais pronunciado em intensidades submáximas de esforço. Nessa amostra de coronariopatas não foi encontrada alterações da bomba ventricular esquerda, avaliada pelo pulso de oxigênio ($11,48 \pm 2,91$ para GC e $12,95 \pm 2,59$ para GS), nem alterações das medidas de V/VO_2 slope ($27,33 \pm 3,24$ para GC e $26,14 \pm 2,77$ para GS), sugerindo que somente em graus mais avançados de comprometimento da reserva funcional possa ocorrer redução dos valores desse parâmetro. Analisando o $\Delta \text{VO}_2/\Delta W$, encontramos uma redução dessa relação no grupo coronariopata ($7,82 \pm 1,3$ para GC e $9,41 \pm 0,91$ para GS, $p=0,0005$), que justificaria uma menor capacidade de metabolizar e disponibilizar o O_2 na periferia, sugerindo, portanto, que o $\Delta \text{VO}_2/\Delta W$ possa representar, no TEE, um marcador alternativo de redução da reserva cardiovascular em pacientes coronariopatas.

CONSUMO ALIMENTAR E ESTADO NUTRICIONAL DE PACIENTES NO PÓS-OPERATÓRIO TARDIO DE CIRURGIA BARIÁTRICA

Simara Paganani Donadelli

Orientadora: Profa. Dra. Carla Barbosa Nonino

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/04/2012

A cirurgia bariátrica desencadeia modificações na anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal que resultam em perda de peso significativa e mudanças no padrão alimentar. Além disso, estudos têm demonstrado deficiências nutricionais específicas e reganho de peso a longo prazo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o consumo alimentar e o estado nutricional no pós-operatório tardio de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Participaram do estudo 39 pacientes após cinco anos de cirurgia pela técnica de derivação gástrica em Y-de-Roux. No quinto ano pós-operatório foi realizada a avaliação de dados antropométricos e da composição corporal, ingestão alimentar, avaliação clínica e bioquímica. O histórico de peso, ingestão alimentar e exames bioquímicos referente aos períodos pré e pós-operatório foram coletados nos prontuários dos pacientes. Observou-se redução de peso a partir do primeiro ano pós-operatório, sendo principalmente à custa de gordura corporal. Após cinco anos a perda do excesso de peso foi em média 64%, porém houve reganho de peso médio de 11%. Houve redução da ingestão alimentar de calorias, fibras, macro e micronutrientes a partir do primeiro ano pós-cirurgia. No final do estudo houve inadequação na ingestão de proteínas em 69% dos pacientes, de cálcio em 87%, de ferro em 59%, de vitamina B12 em 41% e de ácido fólico em 95%. Apesar da suplementação diária com polivitamínicos e poliminerais, observou-se deficiência de ferro em 12,8%, de magnésio em 15,8% e de vitamina B12 em 18,4%. Concluiu-se que as mudanças no padrão alimentar após a cirurgia não foram suficientes para que os pacientes atingissem uma alimentação adequada a longo prazo. Este estudo reforça a necessidade de acompanhamento individual e de suplementação proteica, de vitaminas e minerais.

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA EXPANSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS MULTIPOTENTES EM MICROCARREGADORES

Samia Rigotto Caruso

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/05/2012

As células mesenquimais estromais multipotentes (CMM) são na atualidade uma fonte atrativa para aplicações na engenharia de tecidos e na terapia celular. Devido à baixa disponibilidade nos tecidos (0,01%-0,0005%) e às elevadas doses necessárias para uma infusão (aproximadamente 10^6 células/Kg paciente) tornou-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de expansão *in vitro*, eficientes e de custo reduzido, que permitam a obtenção de CMM com manutenção das características funcionais (diferenciação e inibição da proliferação de linfócitos), imunofenotípicas e citogenéticas. As CMM são células aderentes, ou seja, necessitam de um substrato sólido para se aderir e proliferar. O procedimento convencional de expansão em garrafas estáticas, geralmente envolve um processo laborioso em que não há correto controle e monitoramento dos parâmetros de cultivo e possui uma maior susceptibilidade à contaminação devido à excessiva manipulação para atingir o número ideal de células. Além disso, este tipo de cultivo não permite uma produção em larga escala. Em função disso, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de desenvolver um bioprocessos escalonável, economicamente viável e eficiente para expansão de CMM derivadas da medula óssea em microcarregadores. Para isso, as células foram cultivadas em microcarregador Cyotdex 3, em frasco *spinner* com o meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. Foram avaliadas neste trabalho, a adesão celular aos microcarregadores, crescimento, metabolismo, recuperação celular final e avaliação das propriedades funcionais e imunofenotípicas pré e pós cultivo, comparando ao cultivo já estabelecido em garrafas estáticas. De maneira geral, os resultados obtidos mostraram que foi possível expandir CMM utilizando a tecnologia de microcarregadores. A análise do metabolismo celular mostrou que não houve exaustão de nutrientes importantes como glicose e glutamina durante o cultivo, tampouco formação dos subprodutos lactato e amônia em concentrações inibitórias. As células recuperadas após a expansão mantiveram as características imunofenotípicas e funcionais. A produção média (n=10) foi de aproximadamente $4,9 \times 10^5$ cel/mL. Como o sistema utilizado permite o escalonamento, se utilizássemos um biorreator de 1L, seria possível a produção de aproximadamente 5×10^8 células que seriam suficientes para tratar mais de 3 pacientes de até 70Kg na dose de 2×10^6 células/Kg. Para expansão da mesma quantidade de células na forma tradicional seriam necessárias 135 garrafas de 175 cm² com um custo total de expansão duas vezes superior à estimativa do custo de expansão utilizando microcarregadores.

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA SELETIVO PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS CAUSADORES DE MICOSES ENDÊMICAS

Simone Ferreira Sturza

Orientador: Prof. Dr. Roberto Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/05/2012

Micoses como a paracoccidioidomicose, histoplasmoses e criptococose são endêmicas no Brasil e constituem um problema médico-social pela doença crônica, multifocal e incapacitante que produzem. Por este fato, é de grande importância um diagnóstico preciso para minimizar os danos causados nesses pacientes. Em amostras do trato respiratório a contaminação do material pela microbiota bucal, especialmente por *Candida spp*, dificulta o isolamento dos fungos de interesse. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um meio de cultura seletivo para isolamento de fungos causadores de micoses endêmicas de amostras do trato respiratório, utilizando caspofungina, antifúngico que inibe principalmente *Candida spp*. As espécies de *Candida* foram isoladas no Laboratório de Micologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 2009 a 2011. Outros fungos avaliados foram retirados da micoteca do mesmo laboratório. A caspofungina foi acrescida ao meio de cultura Sabouraud e o meio de cultura foi avaliado pelo crescimento de fungos isolados e com amostras de escarro contaminadas com inóculos mistos de *Candida albicans*/ *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*/ *Histoplasma capsulatum* e *Candida albicans*/ *Cryptococcus neoformans*. O meio de cultura Sabouraud acrescido de caspofungina na concentração 4,0µg/mL não interferiu no crescimento de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cryptococcus spp*. A caspofungina foi efetiva para inibir o crescimento de *Candida albicans*, obtendo-se redução de 42% na concentração 0,125 e 81% na concentração 4,0µg/mL e também de outras espécies de *Candida*. Neste estudo foi observado que

caspofungina atua como inibidor seletivo do crescimento de leveduras em cultura de amostras do trato respiratório quando adicionado em meio Sabouraud, favorecendo o isolamento de fungos como *H.capsulatum*, *P.brasiliensis* e *Cryptococcus neoformans*. Contudo o meio de cultivo avaliado deve ser usado nos primeiros dias após o preparo para manter a máxima inibição de *Candida spp.* O meio seletivo produzido com caspofungina tem potencial para uso em laboratórios de micologia clínica.

SÍNDROME METABÓLICA, RISCO CARDIOVASCULAR E PROTEÍNA C-REATIVA EM AMOSTRA DE INDIVÍDUOS COM PSORÍASE

Renato Soriani Paschoal

Orientadora: Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/05/2012

A psoríase é condição inflamatória crônica que afeta principalmente a pele e articulações. O estado pró-inflamatório crônico compreendido pela produção de citocinas e moléculas de adesão poderia constituir em fator de risco para outras comorbidades, como a síndrome metabólica e a arteriosclerose. A proteína C-reativa consiste em marcador da reação inflamatória sistêmica que parece manter relação com a gravidade e a extensão da doença, e atividade do comprometimento artropático. O presente estudo observacional transversal tem o propósito de analisar a relação entre a síndrome metabólica (SM), o risco cardiovascular (RCV) e os níveis de proteína C-reativa (PC-R) em amostra de indivíduos com psoríase assistidos em serviço de saúde de alta complexidade. Por meio da revisão de prontuários, anamnese e exame físico, foram coletados dados demográficos, clínicodermatológicos, antropométricos e laboratoriais de indivíduos com Psoríase (n=72). Na amostra, a média de idade foi de 48,8 anos, em sua maioria do sexo masculino (66,6%) com predomínio da psoríase vulgar (83,3%). O tempo médio de duração da doença foi de 12,2 anos. Dos indivíduos avaliados, 26,3% preencheram os critérios para o diagnóstico da SM, que manteve a distribuição sem diferenças significantes entre os sexos (29,1% vs 25%) e a prevalência de 33,9% naqueles com idade \geq 40 anos. A idade igual ou superior a 40 anos demonstrou ser a única variável de risco significativa ($OR = 7,28$, $p = 0,04$, $IC95\%$) para a SM. Dislipidemia foi o critério mais prevalente, seguido da hipertensão arterial sistêmica, da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2. Na amostra, 51,3% dos pacientes apresentava psoríase grave e 8,3%, a confirmação da artrite psoriásica, porém sem sinais clínicos de atividade. O tratamento sistêmico (68,0%) predominou sobre o tratamento tópico (32,0%). Dentre os tratamentos sistêmicos a acitretina foi a terapêutica mais utilizada, seguida do metotrexato, da ciclosporina e dos imunobiológicos. O RCV médio em 10 anos pelo escore de Framingham foi de 9,4%. Apesar do RCV mais elevado nos pacientes com a forma grave da doença (10,7%) quando comparado aos dos indivíduos com as formas leves e moderadas (7,7%), esta relação não foi confirmada pelo teste exato de Fisher. Os valores médios do RCV em 10 anos foram semelhantes para os indivíduos sob terapêutica sistêmica e para aqueles sob tratamento tópico. Na amostra, o valor médio dos níveis séricos da PC-R foi de 2,84 mg/L. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os portadores de doença articular controlada e aqueles sob tratamento tópico e sistêmico. Os níveis séricos de PC-R foram superiores (4,32mg/L) entre aqueles com diagnóstico de SM, quando comparados aos indivíduos sem a SM (2,31mg/L); e entre aqueles com RCV alto (5,20mg/L) comparados aos indivíduos com RCV baixo (1,35mg/L). A psoríase, a SM e o RCV elevado parecem compartilhar a elevação da PC-R, e estabelecer consequências comuns, sendo a coexistência potencialmente facilitadora das doenças cardiovasculares e acidentes cerebrais. A coexistência destas condições pode nortear a decisão a favor de medidas precoces de prevenção e de terapêuticas mais efetivas. Palavras-chave: Psoríase. Síndrome X Metabólica. Proteína C-reativa. Doenças Cardiovasculares.

AValiação de Parâmetros Clínicos e Imunológicos Induzidos pela Vacina BCG-ID EM PACIENTES COM HANSENÍASE: SEGUIMENTO DE 5 ANOS

Érika Muller Ramalho Zenha

Orientadora: Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss

Tese de Doutorado apresentada em 31/05/2012

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* e compromete pele e nervos periféricos. Constitui um relevante problema de saúde pública no Brasil, com taxas de prevalência e detecção de 1,56/10000 e 18,2/100000 habitantes, respectivamente, no ano de 2010. As altas taxas de detecção têm dificultado o controle e a eliminação da doença no país, desencadeando a procura de fatores que possam atuar como adjuvantes ao tratamento e eliminação da

infecção. A administração da vacina BCG-id (Bacilo de Calmette Guérin) tem sido utilizada para estimular a reação imunológica de comunicantes de pacientes com hanseníase. Acredita-se também que a combinação da poliquimioterapia (PQT) convencional com essa vacinação deva facilitar a eliminação de bacilos do paciente, reduzir o índice de recidivas após a alta terapêutica e encurtar o período para negativação das baciloscopias, provavelmente, por atividade imunomoduladora, ainda não esclarecida, que resulta no aumento da defesa imunológica do paciente. A investigação do mecanismo de ação do BCG, através de ensaio clínico e laboratorial, em 19 pacientes com hanseníase, 11 multibacilares (MB) e 8 paucibacilares (PB), avaliou a produção “*in vitro*” de IL-10, IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-17 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) desses pacientes, antes e 30 dias após a aplicação de BCG-id. PBMC, isoladas pelo gradiente Ficoll-Hypaque, foram cultivadas na presença de Con-A ou LPS e BCG. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação das citocinas pelo método ELISA. Foi realizada a análise imunohistoquímica, em biópsias de lesão cutânea de pacientes, de IFN γ , IL-1, IL-10, IL-12, TGF β e TNF α antes e 30 dias após a aplicação de BCG-id. Os pacientes foram acompanhados durante cinco anos, sendo avaliados: resposta terapêutica, intercorrências, como episódios reacionais, e resultados de baciloscopia e sorologia anti-PGL-1 pós-tratamento. Os resultados mostraram produção aumentada das citocinas após a aplicação de BCG-id, na presença dos mitógenos (Con-A ou LPS) e do próprio BCG, em pacientes MB e PB, porém com significância estatística para TNF α (p: 0,039) e IL-6 (p: 0,047) em MB e IL-17 (p: 0,043) em PB. As marcações imunohistoquímicas, especialmente TNF α , foram mais intensas nas lesões de MB após BCG-id, provavelmente por indução da imunidade inata. A evolução clínica sugere que BCG-id tem a capacidade de potencializar resposta terapêutica mais efetiva com redução do número e intensidade das reações hansênicas. Esses resultados sugerem que BCG-id induz a ativação da fase inicial da atividade imune celular: imunidade inata (aumento de TNF α e ativação de macrófagos). Logo se pode concluir que o uso de BCG-id pode ser indicado como adjuvante do tratamento da hanseníase, sendo que associado à poliquimioterapia, pode acelerar o processo de cura da infecção.

CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES PROMOVEM A METÁSTASE DE MELANOMA PELA ATIVAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

Lucas Eduardo Botelho

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/06/2012

A interação entre células tumorais e células estromais tem um papel central na progressão neoplásica. As células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) podem se integrar ao microambiente tumoral onde modulam o crescimento dos tumores por meio de distintos mecanismos. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel das MSCs na metástase, a principal causa de morte em pacientes com câncer. Utilizando um modelo de melanoma murino ortotópico, nós demonstramos que MSCs obtidas da medula óssea de camundongos (MO-MSCs) ocupam o nicho perivascular nos tumores primários e aumentam 2,5 vezes a incidência de micrometástases pulmonares quando co-infundidas com células de melanoma B16. Observamos ainda que o meio condicionado das MO-MSCs não altera o potencial de colonização pulmonar das células B16 infundidas sistemicamente. Isto indica que as MO-MSCs modulam as fases iniciais da cascata metastática, durante a qual ocorrem os processos de invasão e intravasão nos vasos sanguíneos. Em correlação com estes efeitos pró-metastáticos, o secretoma das MO-MSCs induziu a transição epitélio-mesenquimal (EMT) nas células de melanoma *in vitro*. Após cultivo em meio condicionado das MO-MSCs, as células B16 adquiriram uma morfologia evidentemente fibroblástica. Ao mesmo tempo, houve o rearranjo dos filamentos de actina e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais como fibronectina, vimentina, FSP1, N-caderina e ZEB2, acompanhado da repressão transcricional de E-caderina. A ativação da EMT pelo secretoma das MO-MSCs resultou na aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma. Após cultivo em meio condicionado de MO-MSCs, as células B16 tiveram seu potencial de ancoragem à fibronectina reduzido, ao passo que houve o aumento na mobilidade e no potencial de invasão em matrizes tridimensionais. Utilizando inibidores competitivos de ATP contra o receptor tirosina-cinase Met, demonstramos que a aquisição de todas as propriedades metastáticas avaliadas e a ativação da EMT nas células de melanoma é mediada pela ativação da via HGF/Met. Estes dados destacam o papel das MO-MSCs no microambiente tumoral como fonte perivascular de moléculas indutoras da EMT, cuja ativação leva a aquisição de traços metastáticos nas células de melanoma. Além disso, a inibição da via HGF/Met pode neutralizar os efeitos das MO-MSCs sobre as células tumorais, contribuindo para a repressão de propriedades fundamentais que sustentam a progressão e a disseminação neoplásica. Estas informações são importantes para o desenvolvimento seguro das MO-MSCs como ferramenta terapêutica e demonstram a importância da sinalização entre MSCs e células tumorais na disseminação metastática. Mais especificamente, estas observações reforçam a inibição da via HGF/Met como uma abordagem promissora para o tratamento da metástase.

VALIDAÇÃO DE ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC) AJUSTADO PELA MASSA GORDA OBTIDO PELA IMPEDÂNCIA BIOELÉTRICA

Mirele S. Mialich Grecco

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Tese de Doutorado apresentada em 22/06/2012

A obesidade é definida como o excesso de tecido adiposo e o IMC tem sido um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico de obesidade devido sua facilidade de aplicação e baixo custo. Entretanto, este índice possui a grande limitação de não diferenciar tecido adiposo e massa livre de gordura. Este trabalho buscou validar o Índice de Massa Corporal ajustado pela massa gorda obtido por impedância bioelétrica previamente desenvolvido por Mialich et al., 2011. Foi realizado um estudo transversal com 501 indivíduos, de ambos os gêneros, com faixa etária entre 17 e 38 anos, matriculados em cursos de graduação da USP do *campus* de Ribeirão Preto. Os indivíduos foram submetidos à aferição de peso, estatura e a avaliação de composição corporal através do equipamento de impedância bioelétrica. Além disso, foram coletadas informações referentes ao padrão alimentar por meio da aplicação de um questionário desenvolvido pelos pesquisadores, e também referente à prática de atividade física através da utilização do questionário IPAQ. A participação dos alunos foi voluntária e todos os indivíduos foram avaliados somente 1 vez no estudo e por um grupo de examinadores treinados. Para validação foi utilizado o modelo de regressão linear, sendo o “IMC ajustado” a variável independente e o “IMC tradicional” a variável dependente. A amostra era composta por 366 mulheres e 135 homens e apresentou médias de idade de $20,8 \pm 3,2$ anos e $20,3 \pm 2,7$ anos; peso $76,9 \text{ Kg} \pm 13,6$ e $57,8 \text{ Kg} \pm 9,2$; estatura $177,3 \text{ cm} \pm 6,7$ e $163,1 \text{ cm} \pm 6,3$; IMC $24,4 \pm 3,8 \text{ Kg/m}^2$ e $21,7 \pm 3,0 \text{ Kg/m}^2$; massa livre de gordura, $60,0 \text{ Kg} \pm 7,7$ e $39,8 \text{ Kg} \pm 3,8$; massa gorda $17,0 \% \pm 6,2$ e $26,6 \% \pm 6,2$, para homens e mulheres, respectivamente. Com relação à validação foram verificados valores elevados e satisfatórios de R^2 sendo, 91,1%, 91,9% e 88,8%, considerando todos os indivíduos, homens e mulheres, respectivamente. Foram definidas também novas faixas de classificação do estado nutricional para ambos os gêneros, considerando este novo IMC ajustado, sendo: 1,35 a 1,65 (risco nutricional para subnutrição), $> 1,65$ e $< 2,0$ (eutrofia) e $> 2,0$ (obesidade). Verificou-se também que este novo índice possui uma capacidade mais acurada de captar indivíduos obesos (0,980; 0,993; 0,974), considerando todos os indivíduos, mulheres e homens, respectivamente, e os pontos de corte para gordura corporal de 25% (homens) e 35% (mulheres), em detrimento ao IMC tradicional (0,932; 0,956; 0,95). Além disso, este trabalho possibilitou a definição de novos pontos de corte do IMC tradicional para a classificação de obesidade, sendo: $25,24 \text{ Kg/m}^2$ e $28,38 \text{ Kg/m}^2$, para mulheres e homens, respectivamente. O novo IMC ajustado foi validado para a população estudada e pode ser adotado na prática clínica. Novos estudos devem buscar a sua aplicação em diferentes etnias assim como a comparação deste índice com outros já descritos previamente na literatura científica.

Farmacologia

PAPEL PROTETOR DO RECEPTOR QUIMIOTÁTICO CCR5 DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL

Fernanda Vargas e Silva Castanheira

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/04/2012

A sepsé é uma resposta inflamatória sistêmica resultante da inabilidade do sistema imune em controlar uma infecção, onde a taxa de sobrevivência está associada ao recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Tem sido demonstrado que a expressão de receptores quimiocínicos pode ser alterada durante a sepsé. Neutrófilos de animais *naïves* respondem às quimiocinas CXCL, mas são irresponsivos às quimiocinas CC. Entretanto, dados do nosso laboratório mostram que a expressão de CXCR2 é reduzida na sepsé, prejudicando a migração de neutrófilos para o foco da infecção. Além disso, ocorre o aparecimento do receptor CCR2 nos neutrófilos, levando à infiltração dessas células no pulmão e outros órgãos. Nesse contexto, o nosso objetivo foi investigar a possível expressão do receptor CCR5 em neutrófilos e seu papel na evolução da sepsé. Demonstramos que animais sham-operados expressam baixos níveis de CCR5 e altos níveis de CXCR2. Entretanto, sob a condição de sepsé experimental induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP), neutrófilos circulantes e que migraram para a cavidade peritoneal expressam altos níveis de CCR5 em paralelo com a internalização de CXCR2. Além disso, animais deficientes para CCR5 (CCR5^{-/-}), submetidos à CLP, apresentam diminuição na taxa de sobre-

vida, redução na migração de neutrófilos para o foco da infecção, aumento da disseminação bacteriana, aumento no infiltrado de neutrófilos no pulmão e aumento nos níveis de marcadores de lesão do coração e rim, quando comparados com animais selvagens (WT). Adicionalmente, a incubação de neutrófilos isolados da medula óssea com LPS aumentou a expressão de CCR5 e os tornou responsivos à MIP-1 β (ligante de CCR5), induzindo quimiotaxia. Também demonstramos que o receptor CCR5 possui importante papel durante a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular para posterior migração. Em conjunto, esses resultados indicam que durante a CLP, o aumento da expressão de CCR5 em neutrófilos tem um papel protetor, visto que animais CCR5^{-/-} sépticos apresentam reduzida migração de neutrófilos para o foco infeccioso, inflamação sistêmica acentuada e baixa taxa de sobrevivência.

AValiação DAS CONCENTRAÇÕES DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR E SEUS INIBIDORES NA HIPERTENSÃO ARTERIAL: EFEITOS DO ENALAPRIL

Vanessa Fontana

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 17/04/2012

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, constituindo um dos principais fatores de risco de eventos cardiovasculares (CV). Uma das classes mais amplamente utilizadas no controle farmacológico da HAS são os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA). Os iECA atuam inibindo a conversão de angiotensina I em angiotensina II - que gera vasoconstrição e retenção de sódio-, e a degradação da bradicinina - um peptídeo vasodilatador. Diferentes membros da classe dos iECA reduzem a incidência de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. Parte deste efeito se deve à redução no remodelamento mal-adaptativo do sistema cardiovascular que acompanha as doenças CV. Na HAS, os iECA reverterem a rigidez arterial e reduzem a razão média/lúmen dos vasos de resistência. As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco que estão envolvidas na reorganização da matriz extracelular durante o processo de remodelamento. A atividade das MMPs é regulada pela interação com seus inibidores endógenos (TIMPs) e alfa-2-macroglobulina (A2M). Estudos com modelos animais de hipertensão demonstraram que as gelatinases, MMP-2 e MMP-9, estão aumentadas na vasculatura. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis circulantes das MMPs -2, -8 e -9 e dos inibidores TIMP-1, -2 e A2M em pacientes hipertensos estágio I e II e paralelamente em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Avaliamos ainda o efeito do tratamento com enalapril sobre os níveis e atividade das MMPs e os níveis dos seus inibidores em pacientes hipertensos e do metabólito ativo enalaprilato, em células endoteliais de cordão umbilical (HUVECs) em cultura. Observamos que os pacientes hipertensos possuem níveis aumentados de MMP-9 quando comparados aos indivíduos normotensos, no entanto não foram observadas diferenças significativas nos níveis de MMP-2, -8 e dos inibidores TIMP-1, -2 e A2M. Semelhante aos achados clínicos, os animais SHR possuem níveis aumentados de MMP-9 com relação aos controles, e os níveis de MMP-2 e A2M são similares. Além disso, os pacientes tratados com enalapril por 8 semanas tiveram a pressão arterial e a atividade da ECA significativamente reduzidas. Entretanto, os níveis e a atividade das MMPs -2, -8 e -9 e dos inibidores TIMP-1 e -2 não foram afetados pelo tratamento com enalapril. O enalaprilato não alterou as quantidades de MMP-9 e TIMP-1 produzidas pelas HUVECs e nem modificou a atividade das MMPs *in vitro*. Em conclusão, a hipertensão clínica e experimental foi acompanhada de níveis circulantes de MMP-9 aumentados, mas não de MMP-2, -8, TIMP-1, -2 e A2M. O enalapril não reverteu as alterações de MMP-9 nos pacientes hipertensos, e seu metabólito ativo, o enalaprilato, não foi capaz de inibir a atividade das MMPs, nem mesmo alterar a produção de MMP-9 e TIMP-1 pelas células endoteliais.

PAPEL DA O-GLICOSILAÇÃO COM N-acetil-GLUCOSAMINA (O-GLcNAc) NAS ALTERAÇÕES VASCULARES ASSOCIADAS A ALTOS NÍVEIS DE ENDOTELINA-1

Victor Vitorino Lima

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Tese de Doutorado apresentada em 30/05/2012

A O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional altamente dinâmica que modula diversas vias de sinalização. O processo de O-GlcNAc é controlado por duas enzimas: UDP-NAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA). A enzima OGT catalisa a adição de N-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de serina ou treonina das proteínas alvo. Por outro lado, a OGA catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas

modificadas. Proteínas com importante papel na função vascular são alvos da O-GlcNAc, e recentemente demonstramos que a expressão de proteínas modificadas com O-GlcNAc está aumentada em artérias de ratos com hipertensão DOCA-sal. Considerando que a produção de endotelina-1 (ET-1) encontra-se aumentada na vasculatura de diferentes modelos de hipertensão sensível ao sal, nós investigamos a hipótese de que o aumento da resposta vascular contrátil induzida pela ET-1 é decorrente da hiperativação da via RhoA/Rho cinase, mediada pelo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc. Durante a realização de nossos experimentos, demonstramos que a exposição de aortas ou células do músculo liso vascular (CMLV) à ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) aumenta a vasoconstrição para fenilefrina (PE) e serotonina, bem como os níveis de proteínas O-GlcNAc, além de modular a expressão das enzimas OGT e OGA. A infusão de ET-1 (2 pmol/Kg/min) por 14 dias também promoveu aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e da resposta contrátil da aorta à PE. O tratamento de aortas ou CMLV com ST045849 (inibidor da OGT, 100 $\mu\text{Mol/L}$) ou atrasentan (antagonista do receptor ETA, 1 $\mu\text{mol/L}$), preveniu o aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc induzido pela ET-1. Além disso, o tratamento com atrasentan por cinco semanas (atrasentan - 5 mg/kg/dia, por via oral) normalizou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc em ratos DOCA-sal e também diminuiu a resposta contrátil da aorta à PE. A transfecção de CMLV com siRNA para OGT aboliu o efeito da ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc. Considerando que o aumento nas contrações da aorta à PE, após o tratamento com PUGNAc (inibidor seletivo da OGA) ou ET-1, foi abolido pelo inibidor de Rho cinase (Y-27632, 1 $\mu\text{mol/L}$) e que a ET-1 ativa a via de sinalização da RhoA/Rho cinase, decidimos investigar se aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc ativa/modula a via RhoA/Rho cinase. A incubação de CMLV com ET-1 não mudou a expressão protéica das formas totais de ROCK- α , ROCK- β , CPI-17, MYPT-1 ou MLC, porém aumentou a expressão das formas fosforiladas da MYPT-1 (Tre853), CPI-17 (Tre38) e MLC (Tre18/Ser19). Estes efeitos não foram observados quando CMLV foram tratadas com ST045849, atrasentan ou previamente transfectadas com o siRNA para OGT. Também observamos que a ET-1 aumentou a atividade e a expressão protéica da RhoA, assim como a expressão da PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF. Este efeito foi abolido, quando CMLV foram previamente transfectadas com siRNA para OGT, incubadas com o inibidor da OGT ou tratadas com o antagonista de receptores ETA. Em conclusão, nossos dados fornecem evidências de que a ET-1 aumenta os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, resultando na ativação da via RhoA/Rho cinase e no aumento da reatividade vascular. É possível que o aumento de proteínas O-GlcNAc, induzido pela ET-1, possa representar um novo mecanismo para a disfunção vascular induzida por este potente peptídeo.

A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA PRESENTE NA ÁREA SEPTAL LATERAL MODULA DE FORMA DISTINTA AS RESPOSTAS AUTÔNOMICAS E COMPORTAMENTAIS DURANTE DIFERENTES SITUAÇÕES AVERSIVAS

Daniel Gustavo dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Tese de Doutorado apresentada em 15/06/2012

A área septal lateral (ASL) é parte do sistema límbico e está envolvida na regulação de respostas defensivas. A lesão eletrolítica ou a administração de benzodiazepínico na ASL causa efeito ansiolítico em animais submetidos a modelos experimentais preditivos da ação de drogas ansiolíticas. Durante situações aversivas, a neurotransmissão colinérgica de estruturas límbicas envolvidas na modulação de respostas comportamentais, autonômicas e neuroendócrinas, é ativada. Terminações colinérgicas localizadas na ASL estão envolvidas no controle da atividade cardiovascular. Além disso, a atividade neuronal da ASL está aumentada durante a exposição a diferentes situações aversivas, tais como modelos de medo condicionado ao contexto e do estresse agudo por restrição. Entretanto, a participação do sistema colinérgico da ASL na modulação das respostas autonômicas e comportamentais observadas nesses modelos não fora devidamente estudada. Portanto, o presente estudo investigou se a inibição da neurotransmissão ou se a administração de fármacos anticolinérgicos afetaria as respostas comportamentais e autonômicas (cardiovascular e termogênica) observadas nos modelos de estresse por restrição ou medo condicionado ao contexto. A injeção do inibidor sináptico não seletivo CoCl₂ na ASL, antes da restrição, reduziu a resposta de elevação da pressão arterial (PAM) e a elevação da frequência cardíaca (FC) mas não a alteração da temperatura corporal observada durante a restrição, tampouco afetou o efeito ansiogênico observado no labirinto em cruz elevado 24 h após a restrição. A injeção de hemicolínio (inibidor da captação de colina) ou atropina (antagonista muscarínico não seletivo) reduziram apenas a elevação da PAM, sem afetar a elevação da FC. Resultados semelhantes foram observados com as doses de 3 e 0,3 nmol de pirenzepina (antagonista preferencial M1) e com a dose de 3 nmol de J104129 (antagonista preferencial M3). A elevação da FC observada durante o estresse por restrição foi reduzida pela injeção de Dtyr-AVP (antagonista vasopressinérgico). A injeção de pirenzepina e Dtyr-AVP reduziram ambas as elevações da PAM e da FC durante a restrição. No modelo do medo condicionado ao contexto a

injeção de CoCl_2 , quando feita apenas antes da sessão de teste, reduziu a resposta emocional condicionada, a qual é caracterizada pela expressão do comportamento de congelamento, elevação da PAM e da FC, sem efeito nos animais não condicionados. As injeções de hemicolínio e atropina na ASL reduziram a resposta emocional condicionada. Resultados semelhantes foram observados com as doses de 3 e 0,3 nmol de pirenzepina e com a dose de 3 nmol de J104129 reexpostos ao contexto aversivo. Esses resultados sugerem que a neurotransmissão colinérgica presente na ASL modula de maneira distinta as respostas comportamentais e autonômicas observadas nos modelos de estresse por restrição e de medo condicionado ao contexto.

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO PRETECTAL ANTERIOR NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ELETROACUPUNTURA EM RATOS

Marcelo Lourenço da Silva

Orientador: Prof.Dr. Wiliam Alves do Prado

Tese de Doutorado apresentada em 18/06/2012

O núcleo pretectal anterior (NPtA) é uma estrutura bilateral, situada entre o diencéfalo e o mesencéfalo envolvida em respostas fisiológicas a estímulos nociceptivos periféricos e nas vias descendentes que controlam impulsos de estímulos nociceptivos à medula espinal. Foi demonstrado que a injeção de naloxona no NPtA bloqueia a analgesia induzida por eletroacupuntura (EA) de baixa, mas não de alta frequência. O envolvimento de receptores opióides, colinérgicos muscarínicos, serotoninérgicos e gabaérgicos na antinocicepção decorrente da estimulação do NPtA foi demonstrado por estudos farmacológicos. Com base neste conhecimento, o presente trabalho investiga a participação de neurotransmissores serotoninérgicos, opióides, gabaérgicos e colinérgicos muscarínicos do NPtA na modulação da nocicepção induzida pela EA de baixa e alta frequência. Ratos Wistar machos foram submetidos a implante crônico de cânula nas porções dorsal (dNPtA) e ventral (vNPtA) do NPtA. Após o período de recuperação, receberam então injeção intracerebral de antagonistas não seletivos naloxona (antagonista OP, 10 ng/0,08 μl), metisergida (antagonista 5HT, 37 pg/0,08 μl), atropina (antagonista M, 10 ng/0,08 μl) e bicuculina (antagonista GABA_A , 150 ng/0,08 μl) e de antagonistas seletivos opióides CTOP (antagonista μ , 6 nmol/0,08 μl), ICI174.864 (antagonista delta, 10 nmol/0,08 μl), Nor-BNI (antagonista kappa, 10 nmol/0,08 μl); e serotoninérgicos methiotepina (antagonista 5HT₁, 1 nmol/0,08 μl), ketanserin (antagonista 5HT₂, 10 nmol/0,08 μl) e MDL72222 (antagonista 5HT₃, 50 nmol/0,08 μl). Após cinco minutos, os animais foram submetidos a EA de 2 ou 100Hz nos pontos *Zusanli* e *Sanyinjiao* por 20 minutos e submetidos a teste de retirada da cauda nos 30 minutos seguintes. O efeito analgésico induzido pela EA de 2 Hz foi inibido pela naloxona, CTOP ou pela atropina e foi menos intenso após a bicuculina, metisergida ou methiotepina previamente administradas no dNPtA. Esse efeito foi menos intenso e de menor duração após a naloxona, CTOP, metisergida ou methiotepina no vNPtA. O efeito da EA de 100 Hz foi menos intenso e de menor duração após a naloxona, CTOP, metisergida ou methiotepina no vNPtA e manteve-se inalterado após a injeção desses antagonistas na dNPtA. Isso nos permite sugerir que o efeito da eletroacupuntura de 2 Hz depende mediação de receptores μ opióides e muscarínicos do dNPtA e envolve modulação gabaérgica e 5HT₁. Ainda, a duração do efeito da eletroacupuntura de 2 e 100 Hz envolve a mediação μ opióide e 5HT₁ somente no vNPtA.

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO GSK1016790A E DO 4aPDD EM ARTÉRIAS ISOLADAS – INDÍCIOS DE QUE OS CANAIS TRPV4 PARTICIPAM DA REGULAÇÃO DAS FUNÇÕES DA CÉLULA ENDOTELIAL

Jânyerson Dannys Pereira da Silva

Orientadora: Profa. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Dissertação de Mestrado apresentada em 26/06/2012

A produção e liberação de substâncias vasodilatadoras pelas células endoteliais requer uma elevação sustentada na concentração intracelular de cálcio; essa elevação é consequente a um influxo de cálcio. Porém, a identidade do (s) canal (is) envolvido (s) nesse influxo ainda não foi (ram) determinada (s) conclusivamente. Existem evidências de que o gene *TRPV4* (que codifica uma proteína permeável a cátions, inclusive ao cálcio) é expresso em células endoteliais. Porém, a falta de agentes que modulem especificamente a função dessa proteína não permitiu que o papel do TRPV4 no controle da função endotelial pudesse ser elucidado. Recentemente foram descritos dois novos compostos, o GSK1016790A (GSK) e o HC-067047 (HC), com ação ativadora e bloqueadora seletiva desse canal, respectivamente. Consequentemente, nesta

dissertação descrevemos e interpretamos os resultados obtidos em experimentos concebidos para caracterizar o efeito do GSK1016790A (e com fins comparativos o efeito do 4 α PDD) em artérias isoladas de várias espécies. Para isso, empregamos anéis de artérias suspensos em cubas para órgão isolado para registro da tensão desenvolvida por esses anéis durante a contração isométrica provocada pela adição de fenilefrina; todos os experimentos foram realizados com solução de Krebs contendo diclofenaco (10 μ M). Inicialmente verificamos mediante imunohistoquímica a presença de imunorreatividade para o TRPV4 no endotélio da aorta torácica de rato. A adição de concentrações isoladas ou cumulativas de GSK produziu relaxamentos dependentes da concentração na aorta torácica de rato (CE_{50} =0,5 nM; $IC_{95\%}$ =0,35-0,72 nM; n=7); o 4 α PDD (1-10 μ M), em concentrações isoladas, também produziu relaxamentos na aorta torácica de rato. Resultados semelhantes foram observados para o GSK na aorta torácica de coelho (CE_{50} = 4,3 nM; $IC_{95\%}$ =3,58-5,14 nM; n=5), de camundongo (CE_{50} =1,4 nM; $IC_{95\%}$ =0,85-2,24 nM; n=3) e de cobaia (CE_{50} =0,2 nM; $IC_{95\%}$ =0,12-0,22 nM; n=4). GSK relaxou também a aorta abdominal (CE_{50} =6,5 nM; $IC_{95\%}$ =3,71-11,3 nM; n=3) e a artéria femoral de coelho (CE_{50} =17 nM; $IC_{95\%}$ =16,8-18,7 nM; n=4); Os relaxamentos produzidos por ambas as drogas apareceram 1-2 min após a adição e atingiram o máximo em 5-8 min, foram reversíveis e não apresentaram taquifilaxia. Em todas as artérias os relaxamentos foram estritamente dependentes de endotélio e da presença de cálcio no meio extracelular. Na aorta torácica de rato, a pré-incubação com HC (5 minutos) aboliu o efeito do GSK sem afetar os relaxamentos produzidos pela acetilcolina. Em todas as artérias testadas os efeitos do GSK e do 4 α PDD foram revertidos completamente pelo HC (1-3 μ M) ou pelo vermelho de rutênio (aorta torácica de rato e artérias de coelho, 1 μ M, VR). Esses resultados demonstram que os canais TRPV4 estão presentes na célula endotelial e que a sua ativação leva à produção de fatores relaxantes. Como corolário, esses resultados constituem indícios de que os canais TRPV4 podem participar da regulação da função das células endoteliais em situações fisiológicas e/ ou fisiopatológicas.

ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO ESPINAL NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ELETROACUPUNTURA DE 2, 100 E 2/100 HZ EM RATOS

Josie Resende Torres da Silva

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Tese de Doutorado apresentada em 26/06/2012

A transmissão da informação nociceptiva está sujeita a modulação exercida por diferentes sistemas que atuam em nível espinal. Receptores opióides, serotoninérgicos, colinérgicos muscarínicos, noradrenérgicos e gabaérgicos já foram identificados na medula espinal. O envolvimento destes na antinocicepção decorrente da eletroacupuntura foi demonstrado por estudos farmacológicos. Com base neste conhecimento, o presente trabalho investiga a participação de neurotransmissores noradrenérgicos, serotoninérgicos, opióides, gabaérgicos e colinérgicos muscarínicos na duração do efeito antinociceptivo induzido pela EA de 2, 100 e 2/100 Hz de frequência. Assim como suas influencias em animais não respondentes. Ratos Wistar machos receberam injeção intratecal de neoestigmina, inibidor da acetilcolinesterase; fluoxetina, inibidor da recaptação de serotonina; desipramina, inibidor da recaptação de noradrenalina; DL-Thiorphan, inibidor da encefalinase; e gabapentina, inibidor da GABA-transaminase. Após cinco minutos, os animais foram submetidos a EA de 2, 100 ou 2/100 Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) por 20 minutos e submetidos a teste de retirada da cauda nos 60 minutos seguintes. Nossos resultados nos permitem sugerir que o sistema opioidérgico, noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico muscarínico são importantes na manutenção do efeito duradouro da EA de 2, 100 e 2/100 Hz. Foi encontrado que a neurotransmissão gabaérgica parece não influenciar a EA, enquanto que em animais não respondentes, o sistema opioidérgico, serotoninérgico e colinérgico parecem ser importantes na EA de 2Hz; os receptores colinérgicos e serotoninérgicos na EA de 100 Hz e o sistema opioidérgico e serotoninérgico na EA 2/100 Hz.

EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SOBRE O REMODELAMENTO VASCULAR EM RATOS HIPERTENSOS RENAIS 2R-1C

Alisson Martins de Oliveira

Orientador: Prof.Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Tese de Doutorado apresentada em 29/06/2012

O sistema renina-angiotensina é um importante mediador das alterações vasculares presentes no processo hipertensivo. Neste sentido, inúmeras evidências têm mostrado que as metaloproteinases da matriz extracelular (*MMP*, *matrix*

metaloproteinase) contribuem para o remodelamento vascular associado a hipertensão. Contudo, ainda são desconhecidos os efeitos dos tratamentos com o losartan (antagonista de receptores de angiotensina II do tipo 1) e/ou alisquireno (inibidor da atividade de renina) sobre o remodelamento vascular e expressão de MMP-2 induzidos pela hipertensão dois rins, um clipe (2R-1C). Ratos sham e 2R-1C foram tratados com alisquireno (50 mg/kg/dia) ou losartan (10mg/kg/dia) ou ambos por gavagem durante 4 semanas. A pressão arterial sistólica foi monitorada semanalmente por pletismografia de cauda. A atividade de renina (ARP) e as concentrações de angiotensina I, II (Ang I e II) e de nitrito foram avaliadas no plasma. Anéis de aorta foram isolados para verificar o relaxamento dependente do endotélio. A análise morfométrica das aortas foi realizada em cortes corados com hematoxilina/eosina e o conteúdo de colágeno e elastina foi avaliado em cortes de aorta pelas colorações de picrosirius e orceína. Os níveis de MMP-2 e a atividade gelatinolítica foram determinados por zimografia em gel e *in situ*, respectivamente. A expressão aórtica da MMP-2, do fator de crescimento transformado-beta-1 (*TGF-β1*, *transforming growth factor-beta-1*) e do receptor de prorenina (*PRR*, *prorenin receptor*) assim como a fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (*ERK-1/2*, *extracellular signal-regulated kinase*) foi avaliada por *western blotting*. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade da β-NAD(P)H oxidase e os níveis de Ang II foram medidos em aortas. O alisquireno, losartan ou a associação das drogas atenuaram de forma similar a pressão arterial em ratos 2R-1C ($p<0,05$). O alisquireno reduziu a ARP e os níveis de Ang I e II no plasma de ratos hipertensos ($p<0,05$). O losartan e a associação das drogas reverteram a disfunção e o remodelamento vascular, preveniram os aumentos no conteúdo de colágeno e elastina aórtico, além de terem atenuado a atividade gelatinolítica e os níveis de MMP-2 em ratos 2R-1C ($p<0,05$). Além disso, o losartan e a combinação das drogas aumentaram os níveis circulantes de nitrito e diminuíram a produção vascular de EROs em ratos hipertensos ($p<0,05$). A combinação das drogas reduziu a atividade vascular da β-NADPH oxidase ($p<0,05$). O losartan em monoterapia ou associado ao alisquireno reverteu a fosforilação da ERK 1/2 e a aumentada expressão do TGF-β₁ em ratos 2R-1C ($p<0,05$). A expressão vascular do receptor de prorenina não foi modificada entre os grupos ($p>0,05$). Por outro lado, o alisquireno em monoterapia produziu efeitos menos evidentes sobre a maioria dos parâmetros avaliados nesse estudo, apesar do pronunciado efeito anti-hipertensivo.

Fisiologia

EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA COLECISTOCININA (CCK) SOBRE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ESTIMULADOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Rafael Simone Saia

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

Tese de Doutorado apresentada em 09/04/2012

A hipótese atualmente prevalente é de que parte das manifestações clínicas durante a sepse seja causada pela desregulação da resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro frente à infecção. A síntese excessiva de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO), especialmente por macrófagos/monócitos e neutrófilos, comprometem a função cardiovascular, provocando sua evolução para o choque endotoxêmico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do peptídeo colecistocinina (CCK) na modulação da resposta inflamatória, utilizando o modelo *in vivo* de endotoxemia em ratos, bem como *in vitro* de cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Nossos resultados mostraram que a CCK tem concentração plasmática aumentada durante a endotoxemia, enquanto o bloqueio da sua ação por antagonista de receptores de CCK (proglumide) agravou a hipotensão e também aumentou a produção de fator de necrose tumor (TNF)-α. Além disso, a administração de baixa dose de CCK (0,4 µg/kg) reverteu a hipotensão e a hiperlactatemia induzidas pelo LPS, aumentando a produção de interleucina (IL)-10 e também reduzindo a síntese de NO derivado da iNOS na aorta, fígado e baço. A partir desses efeitos benéficos da CCK em ratos endotoxêmicos, demonstrou-se que os mesmos foram reproduzidos em cultura de macrófagos peritoneais, nos sugerindo que este possa ser um dos alvos de ação desse peptídeo. Em macrófagos, a CCK diminui a expressão da iNOS e a síntese de NO através de mecanismos dependentes do fator nuclear (NF)-κB, AMP cíclico - proteína quinase A (PKA) e IL-10. Essas ações foram mediadas principalmente pelos receptores CCK-1, os quais sofrem aumento na expressão induzido pelo LPS, enquanto os CCK-2R são expressos em quantidades indetectáveis. Nossos dados apresentados demonstram um papel anti-inflamatório da CCK, sugerindo ser assim um agente terapêutico promissor adjuvante ao tratamento na sepse, possibilitando melhora na função cardiovascular.

EFEITO AGUDO DA HIPÓXIA INTERMITENTE NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE RATOS: PAPEL DOS GLICOCORTICÓIDES

Franciele Przygodda

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Dissertação de Mestrado apresentada em 12/04/2012

O processo adaptativo a hipóxia implica em modificações nas funções endócrinas e metabólicas. Embora seja bem estabelecido que o metabolismo de carboidratos é profundamente alterado pela hipóxia, muito pouco se sabe acerca dos efeitos *in vivo* do estresse hipóxico no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos agudos da hipóxia intermitente nos processos de síntese e degradação proteica em músculos esqueléticos de ratos e a possível participação dos glicocorticóides na resposta induzida pela hipóxia. Para isso, ratos jovens (~80g) foram expostos à hipóxia intermitente aguda (HIA) por 8 horas (6% O₂ durante 40 segundos em intervalos de 9 minutos). Os resultados mostram que a HIA é uma situação catabólica que resulta no aumento da glicose e insulina plasmática, na redução do conteúdo do glicogênio hepático (97%), oxidação de glicose muscular (40%) e massa do tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal (30%), sem alterações na massa muscular. No metabolismo protéico, os animais hipóxicos apresentaram aumento da proteólise total em músculos *soleus* e EDL acompanhada por uma hiperativação dos sistemas proteolíticos dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma e dependente de cálcio, sem que houvesse alterações na síntese protéica. Essa resposta foi associada ao maior conteúdo de proteínas miofibrilares conjugadas à Ub e à ativação da expressão de genes relacionados à atrofia (atrofina-1 e MuRF1) e autofagia (LC3 e GABARAP). Adicionalmente, em músculos *soleus*, observou-se redução da fosforilação da Akt (Ser473), uma proteína chave no controle do metabolismo protéico. Verificou-se ainda que a adrenalectomia em animais hipóxicos preveniu a ativação dos sistemas proteolíticos e a transcrição do RNAm dos "atrogenes" sem alterar a autofagia.

Esses dados mostram que a HIA, durante 8 horas, age como um gatilho catabólico no processo de degradação de proteínas dependente de Ub-proteassoma e cálcio assim como na hiperexpressão de genes relacionados à atrofia e autofagia. A ativação do programa atrofico induzido pela HIA parece ser mediada pelos glicocorticóides sendo esta resposta provavelmente importante para o fornecimento de aminoácidos do músculo para o fígado e manutenção da hiperglicemia. Portanto, essa resposta catabólica se sustentada pode levar à perda de massa muscular esquelética em situações de exposição prolongada à hipóxia intermitente.

ESTIMULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SISTEMA NERVOSO PARASSIMPÁTICO PELA PIRIDOSTIGMINA SOBRE OS REFLEXOS CARDIORRESPIRATÓRIOS, CONTROLE AUTÔNOMICO E FUNÇÃO CARDÍACA EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

João Paulo Jacob Sabino

Orientador: Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado

Tese de Doutorado apresentada em 16/04/2012

A hiperatividade simpática na insuficiência cardíaca (IC) vem sendo exaustivamente investigada, levando ao desenvolvimento de abordagens farmacológicas com o intuito de atenuar o aumento do sistema nervoso simpático na IC. Por outro lado, o desenvolvimento de métodos que previnem a atenuação do tônus parassimpático cardíaco na IC não vem recebendo a mesma atenção por parte dos pesquisadores. Estudo prévio do laboratório demonstrou um efeito protetor da piridostigmina (um inibidor da acetilcolinesterase) sobre o barorreflexo, controle autonômico cardíaco e função cardíaca, em ratos com quatro semanas de IC. No entanto, ainda não foi investigado, no rato, o efeito da piridostigmina sobre o quimiorreflexo periférico e central, reflexo Bezold-Jarisch, controle barorreflexo da frequência cardíaca (FC), controle autonômico e função cardíaca em um estágio mais tardio da IC. Assim, o presente estudo avaliou, em ratos com seis a sete semanas de IC, o efeito da piridostigmina sobre os seguintes aspectos: pressão arterial média (PAM); FC; quimiorreflexo periférico e central; reflexo Bezold-Jarisch; barorreflexo espontâneo, índice do barorreflexo; variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS); controle autonômico cardíaco, frequência intrínseca de marcapasso (FIMP); função cardíaca. A IC não alterou os seguintes parâmetros: a FC, as respostas hemodinâmicas aos dois níveis de hipóxia (15 e 10% O₂), as respostas hemodinâmicas à hipercapnia com 5% CO₂, a resposta ventilatória à hipóxia com 15% O₂, a resposta da PAM à hipercapnia com 10% CO₂, o reflexo Bezold-Jarisch, a variabilidade do IP e o tônus simpático cardíaco.

No entanto, a piridostigmina promoveu os seguintes efeitos nos ratos IC: impediu o aumento da ventilação pulmonar em resposta à hipóxia com 10% O₂ (SHAM:422±42; SHAM+P:357±56; IC:592±67; IC+P:417±30 mL/kg/min); preveniu a redução da sensibilidade espontânea do barorreflexo (SHAM:1,5±0,1; SHAM+P:1,24±0,1; IC:0,98±0,06; IC+P:1,67±0,31 ms/mmHg), do índice barorreflexo (SHAM:-2,8±0,3; SHAM+P:-2,6±0,2; IC:-1,3±0,1; IC+P:-2,4±0,3 bpm/mmHg), da potência da banda de baixa frequência (LF) da PAS (SHAM:3,3±0,4; SHAM+P:3,1±0,5; IC:1,2±0,2; IC+P:2,9±0,8 mmHg²), do tônus parassimpático cardíaco (SHAM:90±15; SHAM+P:79±12; IC:39±12; IC+P:87±11 bpm), e da FIMP (SHAM:401±8; SHAM+P:410±9; IC:363±7; IC+P:410±5 bpm). A piridostigmina, contudo, não impediu o aumento da ventilação pulmonar em resposta à hipercapnia com 5% CO₂ (SHAM:462±59; SHAM+P:450±106; IC:725±38; IC+P:582±114 mL/kg/min) e com 10% CO₂ (SHAM:722±79; SHAM+P:696±93; IC:995±65; IC+P:804±101 mL/kg/min). De forma semelhante, a piridostigmina não evitou a redução da PAM (SHAM:109±2; SHAM+P:110±2; IC:97±2; IC+P:99±2 mmHg), não impediu a atenuação da FC em resposta à hipercapnia com 10% CO₂ (SHAM:-79±10; SHAM+P:-59±11; IC:-40±6; IC+P:-54±9 bpm), e não melhorou os parâmetros de função cardíaca: +dP/dt (SHAM:8615±345; SHAM+P:8869±482; IC:5356±326; IC+P:6196±491 mmHg/s), -dP/dt (SHAM:-9137±264; SHAM+P:-9091±633; IC:-4454±357; IC+P:-5288±619 mmHg/s), EDP (SHAM:6±0; SHAM+P:6±1; IC:12±1; IC+P:10±1 mmHg) e pressão sistólica (SHAM:118±3; SHAM+P:123±4; IC:103±4; IC+P:114±6 mmHg) em ratos IC. Com isso pode-se concluir que a estimulação farmacológica do sistema nervoso parassimpático pela piridostigmina parece ser uma abordagem capaz de aumentar a função parassimpática e, conseqüentemente, proteger a alteração de alguns parâmetros fisiológicos na IC.

AÇÃO DA LEPTINA SOBRE O SISTEMA NITRÉRGICO NO CONTROLE DA SECREÇÃO DE GONADOTROFINAS E PROLACTINA

Bruno Del Bianco Borges

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Tese de Doutorado apresentada em 18/04/2012

O neurônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é o principal controlador do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). A leptina age sobre o HHG liberando GnRH e gonadotrofinas, possivelmente por via indireta, pois neurônios GnRH não possuem receptores para leptina (OB-R). O óxido nítrico (NO) tem sido sugerido como um possível mediador desta ação da leptina, a qual é dependente da ação estrogênica. O objetivo deste trabalho foi verificar se a ação da leptina, sobre a secreção de gonadotrofinas e de prolactina, na tarde do proestro, pode ser mediada pelo sistema nitrérgico e ter influência da ação estrogênica.

Métodos: Ratas Wistar com ciclo estral regular receberam uma cânula no ventrículo lateral e após recuperação foram tratadas com antagonista de estrógeno, Tamoxifen s.c. (TMX, 3mg/rata), em metaestro e diestro. No dia seguinte, os animais em proestro receberam leptina i.c.v. (0,3; 1; 3 e 10µg/µl) às 11h e foram decapitados às 17h para a coleta de cérebro e sangue. Animais ovariectomizados foram sacrificados no mesmo horário como controle adicional. Hormônio luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) e prolactina (PRL) foram analisados no plasma por radioimunoensaio. MPOA e MBH foram microdissecados para a análise da expressão gênica (qRT-PCR) e protéica (western blotting) para NOSn e OB-R.

Resultados: A leptina não alterou a secreção de FSH mas amplificou a secreção de LH e PRL, nas doses de 3 e 10µg, respectivamente. O TMX inibiu a secreção de LH, FSH e PRL na tarde do proestro e bloqueou o efeito da leptina sobre a secreção de LH e PRL. A dose de 10µg de leptina diminuiu a expressão gênica e o conteúdo protéico de NOSn na MPOA. No HMB, 1µg de leptina aumentou a expressão gênica para NOSn, enquanto 10µg de leptina aumentou apenas o conteúdo protéico para NOSn. O TMX diminuiu apenas a expressão gênica para NOSn na MPOA, porém não teve efeito sobre a expressão de NOSn no HMB. A ovariectomia diminuiu a expressão gênica e o conteúdo protéico para NOSn na MPOA, e apenas expressão gênica para NOSn no HMB. O TMX não alterou a expressão gênica nem protéica para OB-R na MPOA e no HMB, porém a ovariectomia diminuiu o RNAm para OB-R apenas na MPOA.

Conclusão: A amplificação da secreção de LH e PRL na tarde do proestro causada pela leptina pode ser mediada pelo sistema nitrérgico sob influência da ação estrogênica. O estrógeno altera a expressão do sistema nitrérgico principalmente na MPOA. A diferença de efeitos da ovariectomia e do TMX sobre expressão gênica para OB-R na MPOA indica que outros fatores ovarianos também podem estar envolvidos ou a dose e/ou tempo de administração do TMX não foram suficientes para mimetizar a redução de estrógeno provocada pela ovariectomia.

PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES CRH NA RESPOSTA DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GONADA AO ESTRESSE AGUDO EM PROESTRO

Guillermo Andrey Ariza Traslaviña

Orientador: Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci

Tese de Doutorado apresentada em 25/04/2012

O estresse agudo pode alterar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) dependendo das concentrações de estrogênio. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) age através de receptores CRH-R1 e CRH-R2, que tem como antagonistas seletivos antalarmin e astressin2-B, respectivamente.

Objetivo: verificar se os efeitos do estresse agudo na secreção de hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) em proestro são mediados pelos receptores CRH nos núcleos: leito da estria terminal-divisão lateral (BSTL), central da amígdala (CeA), noradrenérgicos A1, A2 e locus coeruleus (LC).

Métodos: ratas Wistar ciclando regularmente receberam antalarmin (1 mg/kg i.v.), astressin2-B (4.2 nmol i.c.v.) ou veículos 30 minutos antes de serem submetidas a estresse de contenção por 30 minutos - pela manhã ou à tarde no dia de proestro -. Foi coletado sangue para dosagens hormonais e cérebro para imunofluorescência (CRH/FOS no BSTL, PVN, CeA, e tirosina hidroxilase -TH/FOS nos núcleos A1, A2 e LC).

Resultados: o estresse pela manhã provocou aumento de LH e FSH, que foi bloqueado por antalarmin. Astressin2-B bloqueou somente o aumento de FSH. A atividade no LC e A2 induzida pelo estresse foi revertida somente por antalarmin. O estresse à tarde aboliu ou retardou os picos pré-ovulatórios de LH e FSH, efeito revertido somente por astressin2-B. O estresse aumentou a secreção de corticosterona e progesterona, efeito atenuado somente por antalarmin. A atividade intensa do PVN foi atenuada por antalarmin e astressin2-B.

Conclusão: durante o proestro, o estresse agudo pode facilitar (via CRH-R1) ou inibir (via CRH-R2) o eixo HPG. Os núcleos LC e A2 medeiam a resposta de facilitação, mas não a de inibição.

EFEITOS DA HIPÓXIA CRÔNICA INTERMITENTE SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO NTS E AS PROPRIEDADES INTRÍNSECAS DOS NEURÔNIOS RETÍCULO-ESPINHAIS RESPIRATÓRIOS E PRÉ-SIMPÁTICOS DA REGIÃO VENTRAL DO BULBO DE RATOS

Carlos Eduardo Lopes Almado

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mauricio Xavier Leão

Tese de Doutorado apresentada em 04/05/2012

No presente estudo investigamos os efeitos da hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre a neurotransmissão glutamatergica em neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) e sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios retículo-espinhais pré-simpáticos e respiratórios do bulbo ventro-lateral. Para isso, utilizamos ratos Wistar jovens (P19-P21) submetidos à HCI (6% de O₂ por 30 a 40 seg, a cada 9 minutos, 8 horas por dia) por 10 dias, enquanto ratos controle foram mantidos em condições de normóxia (20,8% de O₂) durante o mesmo período. Utilizamos a técnica de *whole cell patch-clamp* para estudo da neurotransmissão e propriedades eletrofisiológicas desses neurônios. Observamos que a HCI reduziu a amplitude das eEPSCs seletivamente nos neurônios considerados de segunda ordem de acordo com o desvio padrão das latências (DPL) das correntes sinápticas evocadas por estimulação do TS. A investigação dos mecanismos envolvidos nessa redução revelou que a HCI não afeta a probabilidade de liberação vesicular (P_R) das sinapses do TS sobre esses neurônios, uma vez que depressão a curto prazo dessas correntes não se mostrou alterada. Adicionalmente, observamos que a HCI não altera os receptores não-NMDA pós-sinápticos pelo fato de não termos verificado diferenças na amplitude das eEPSCs uníquânticas (tamanho dos quanta, q) obtidas pela substituição do cálcio extracelular por estrôncio (eEPSCs assíncronas - aeEPSCs), ou por meio da estimulação mínima do TS. Concluímos que a HCI reduz a corrente pós-sináptica glutamatergica do TS reduzindo o conteúdo quântico (m , que é o produto da P_R pelo número de sinapses funcionais, n) diminuindo o parâmetro n . Além disso verificamos que a HCI reduz igualmente a amplitude das eEPSCs via receptores NMDA, o que sugere que a redução do n não ocorre por internalização seletiva dos receptores não-NMDA pós-sinápticos, mas provavelmente por um mecanismo de silenciamento sináptico. Observamos também que os efeitos da HCI são revertidos após três semanas do término da HCI, também por meio da participação de mecanismos compensatórios distintos aos que produziram a depressão inicial. Finalmente, observamos que a HCI não afeta a excitabilidade intrínseca dos neurônios retículo-espinhais respiratórios e pré-simpáticos do bulbo ventral que são fundamentais para geração do ritmo respiratório e atividade eferente simpática, respectivamente, sugerindo que os efeitos da HCI não são devidos a alterações na excitabilidade intrínseca desses neurônios. Concluímos que a HCI deprime a neurotransmissão

entre o TS e neurônios de segunda ordem do NTS por silenciamento sináptico, efeito esse que é revertido após 3 semanas de normóxia pela contribuição de mecanismos compensatórios. Além disso, a HCI parece não determinar maiores alterações nas propriedades intrínsecas de membrana dos neurônios retículo-espinhais da região rostroventrolateral do bulbo.

CONTROLE NEUROENDÓCRINO DO APETITE AO SÓDIO APÓS DIETA HIPOSSÓDICA: REGULAÇÃO INTEGRADA DO DRIVE APETITIVO E SUA CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

André de Souza Mecawi

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada em 18/05/2012

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar os mecanismos neuroendócrinos envolvidos no controle do apetite ao sódio e das alterações comportamentais relacionadas, após restrição do conteúdo de sódio na dieta. Para isso, ratos Wistar machos adultos receberam dieta normossódica (1% NaCl) ou hipossódica (< 0,1% NaCl) durante quatro dias. Para avaliar as alterações neuroendócrinas e comportamentais foram utilizadas as seguintes técnicas: dosagens hormonais por radioimunoensaio, avaliação da atividade neural através de imunistoquímica para os antígenos relacionados à proteína Fos (ARP-Fos), RT-PCR, hibridização *in situ*, análise da ingestão de água e salina hipertônica (NaCl 0,3 M) em protocolo de livre escolha e teste do labirinto em cruz elevado. Durante a restrição de sódio na dieta os animais apresentaram uma redução significativa na ingestão de água, excreção urinária de sódio, e volume urinário, associado à redução da volemia (aumento do hematócrito e proteínas plasmáticas), pressão arterial média e do ganho de peso, sem alterações significativas na concentração plasmática de sódio. Após o oferecimento da salina hipertônica, os animais privados de sódio apresentaram um aumento significativo da ingestão de salina, associado a um menor aumento na ingestão de água, o que resultou no aumento da preferência ao sódio em relação aos animais controle. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de vasopressina (AVP), peptídeo natriurético atrial (ANP), prolactina (PRL) e corticosterona (Cortico) nos animais privados de sódio em relação aos controles. Por outro lado, os animais com restrição de sódio apresentaram aumento significativo na concentração plasmática de angiotensina I (ANG I) e II (ANG II) e redução na concentração plasmática de ocitocina (OT), sem diferença na concentração cerebral de ANG I e II e neurohipofisária de AVP e OT em relação aos controles. A dieta hipossódica induziu um aumento na expressão do RNAm para renina no rim e para angiotensinogênio no fígado, sem alterar significativamente a expressão da enzima conversora de angiotensina no pulmão. Verificou-se ainda que a restrição de sódio aumentou a expressão do RNAm para os receptores AT₁α no órgão subfornicial (SFO) e no núcleo dorsal da rafe e diminuição nos núcleos supraóptico (SON) e pré-óptico mediano (MnPO), sem diferenças significativas nos núcleos paraventricular (PVN) e do trato solitário (NTS) em relação aos controles. O bloqueio farmacológico dos receptores AT₁ cerebrais e da geração cerebral de ANG II levou a redução da ingestão de água e salina hipertônica após a dieta hipossódica. Observou-se ainda o aumento da fosforilação da ERK na lâmina terminal e no hipotálamo dos animais que receberam dieta hipossódica em relação aos animais controles, resposta que não foi alterada significativamente pela microinjeção intracerebroventricular (icv) de losartan. A microinjeção icv do inibidor da via das MAPKs (PD98059) induziu uma redução na ingestão de salina hipertônica e água após a dieta hipossódica. Por outro lado, a microinjeção icv de ANG II causou um aumento similar na ingestão de água e salina hipertônica e na fosforilação da ERK na lâmina terminal e hipotálamo nos animais que receberam dieta normossódica e hipossódica. A restrição de sódio na dieta dos animais, induziu um aumento significativo nos neurônios ativos do órgão vascular da lâmina terminal (OVLt), MnPO e SFO, e redução na atividade dos neurônios catecolaminérgicos do NTS comissural e dos neurônios ocitocinérgicos das regiões magnocelular medial e parvocelular posterior do PVN, o que foi avaliado pela imunorreatividade para os ARP-Fos. Associado a isso, os animais que receberam a dieta hipossódica apresentaram uma redução da expressão do RNAm para OT no PVN e SON, avaliado através de RT-PCR e hibridização *in situ*. Adicionalmente, a microinjeção de ocitocina icv levou à inibição da ingestão de salina hipertônica e água após a dieta hipossódica. A dieta hipossódica induziu um aumento da exploração associada às respostas ansiolíticas no teste do labirinto em cruz elevado em relação aos animais controles. Além disso, os animais privados de sódio apresentaram uma potencialização da resposta de aumento da concentração plasmática de PRL e ANG I e II induzidas pelo teste do labirinto em cruz elevado. Assim, os presentes dados nos levam a concluir que: 1) a dieta hipossódica por quatro dias é eficiente na indução do apetite ao sódio; 2) a ANG II, a ocitocina e a via intracelular das MAPKs parecem estar envolvidas na ingestão de fluidos após a dieta hipossódica; 3) por outro lado, a redução da atividade do sistema catecolaminérgico no NTS comissural pode estar envolvida com a liberação do apetite ao sódio após a dieta hipossódica; 4) por fim, os dados apresentados demonstram pela primeira vez que o apetite ao sódio está associado ao aumento da exploração e redução da ansiedade, o que foi associado ao aumento de respostas neuroendócrinas ao estresse induzido pelo labirinto em cruz elevado.

ESTRESSE INDUZ SÍNDROME DE OVÁRIO POLICÍSTICO EM RATAS POR ATIVAÇÃO DE RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS

Paulo de Tarso Silva Barros

Orientadora: Profa. Dra. Janete A. Anselmo Franci

Dissertação de Mestrado apresentada em 06/06/2012

A síndrome do ovário policístico (SOP) é uma endocrinopatia de características heterogêneas e é considerada a principal causa de infertilidade em mulheres em idade reprodutiva. Apesar de ter sido documentada há quase 80 anos, sua etiologia continua desconhecida até os dias de hoje. Pesquisas anteriores do nosso laboratório mostraram que a exposição de ratas ao estresse por frio, tipo de estresse que reconhecidamente ativa apenas o sistema simpático, por um período de oito semanas, induziu a formação de cistos foliculares no ovário e alterações hormonais semelhantes à SOP nos humanos. Entretanto, uma avaliação temporal da atividade simpática no ovário mostrou que ela está inalterada após oito semanas, mas aumentada após quatro semanas de exposição ao frio. Neste trabalho, investigamos se as quatro primeiras semanas de exposição ao frio são suficientes e cruciais para a instalação da SOP. Para tal, os animais foram expostos a quatro semanas de estresse por frio e após, permaneceram na sala por mais quatro semanas. O estresse induziu irregularidades no ciclo estral, diminuição de 64,7% na taxa ovulatória, bem como alterações na morfologia e na função endócrina ovariana. Os folículos saudáveis pré-antrais e antrais foram reduzidos em 74% e 69,8%, respectivamente. O número de folículos em atresia pré-antrais e antrais aumentou 10 e 8 vezes, respectivamente. O número de folículos antrais com hipertecose, folículos tipo III (ou pré-cistos) e cistos foliculares aumentou em dez, seis e dezessete vezes, respectivamente, quando comparado com o de animais não estressados. Houve aumento na concentração plasmática de estradiol, do androgênio dehidroepiandrosterona (DHEA) e uma tendência a aumento na concentração de testosterona. Uma vez que 4 semanas de exposição ao frio foram suficientes para o desenvolvimento das características da SOP observadas após 8 semanas de estresse por frio, este modelo foi utilizado para investigarmos se o bloqueio de receptores noradrenérgicos do tipo β com propranolol, seria capaz de impedir a instalação da SOP. Para tal, animais foram expostos a 4 semanas de estresse por frio, durante as quais foi fornecido a um grupo propranolol (40 mg/Kg) dissolvido na água de beber e a outro, apenas água e permaneceram mais 4 semanas sem estresse ou propranolol. O tratamento com propranolol preveniu: 1) as irregularidades no ciclo estral, 2) a redução da taxa de ovulação, 3) a redução do número de folículos saudáveis, 4) o aumento no número de folículos atresiais, de folículos com hipertecose, de pré-cistos e cistos ovarianos e 5) o aumento de estradiol e de androgênios, alterações estas características da SOP e observadas nos animais estressados sem tratamento com propranolol. Portanto, o estresse por frio durante 4 semanas mostrou-se um bom modelo para induzir a instalação da SOP, e o bloqueio dos receptores noradrenérgicos pelo propranolol foi eficiente em prevenir o aparecimento das características típicas desta síndrome.

Genética

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Adriana Renzi

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo

Tese de Doutorado apresentada em 03/04/2012

A maturação *in vitro* de oócitos (MIV) é uma importante tecnologia reprodutiva a qual gera oócitos maduros capazes de suportar o desenvolvimento embrionário pré-implantacional e sua completa evolução à termo. Muitos fatores levam ao processo de maturação do oócito, e o AMH (hormônio anti-Mülleriano) tem demonstrado possuir um importante efeito nesta etapa. Neste trabalho nós demonstramos a influência da suplementação de AMH na maturação de complexos *cumulus*-oócito (COCs). Nossos resultados demonstram que não houve efeito na produção de embriões para COCs grau I. Entretanto, pudemos encontrar diferenças significativas entre os COCs graus II e III maturados na presença de 150ng/ml de AMH. Aqui também demonstramos que não houve diferença significativa na expressão relativa de mRNA para os genes AMHRII e FSHR no oócito, e na expressão relativa de mRNA para os genes AMH, AMHRII e FSHR nas células da granulosa. Nossos resultados corroboram com as importantes funções do AMH na produção de embriões, sugerem que a suplementação do meio de maturação de oócitos com AMH pode ajudar a melhorar a produção de blastocistos.

Pipeline PARA ANÁLISE EM SILICO DE DADOS DE EXPRESSÃO DE MIRNAS E MRNAS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Luiz Fernando Martins Pignata

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/04/2012

Os microRNAs estão envolvidos no processo de regulação da expressão gênica da célula, onde a molécula de microRNA se liga com o RNA mensageiro interrompendo, assim, a expressão do respectivo gene pela interrupção da tradução. A bioinformática tem auxiliado na identificação de vários genes codificadores de microRNAs em plantas e animais, incluindo mamíferos, por meio de análises de dados de *microarray*; assim como na predição de estruturas. Os dados de expressão de microRNAs e RNAs mensageiros foram obtidos por meio de cooperação firmada entre o Laboratório de Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, coordenado pela orientadora desse projeto, e o Laboratório de Imunogenética Molecular do mesmo departamento, coordenado pelo Professor Doutor Geraldo A. S. Passos. Durante o desenvolvimento e os testes realizados, foram utilizados dados (valores numéricos de dados de expressão coletados por *microarrays*) provenientes da comparação da expressão de microRNAs e RNAs do timo de camundongos *non obese diabetic* que reproduzem diabetes melitus do tipo 1, e dados provenientes da comparação da expressão de microRNAs e RNAs de outros experimentos. O presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um *pipeline* para a análise *in silico* de dados de expressão gênica de microRNAs e mRNAs obtidos por *microarray*. Com base em dados de expressão de microRNAs e RNAs mensageiros, foi possível a análise de diversas ferramentas e o desenvolvimento e ajuste de *scripts* para que seja possível a análise sequencial de tais dados. Dessa forma, o *pipeline* desenvolvido inclui a quantificação dos dados de expressão gênica a partir das lâminas de *microarray*, a normalização dos dados, as análises estatísticas das sequências diferencialmente expressas utilizando o *Multi Experiment Viewer*, a construção de redes de interação microRNAs-RNAs mensageiros e a busca de alvos de microRNAs baseada nesta rede, ambos pelo GenMir⁺⁺. O *pipeline* desenvolvido é executado com facilidade e possibilitou a correta análise dos dados, evitando desperdício de tempo em análises de bancada. A partir dos resultados obtidos, novos alvos de miRNA foram encontrados com o uso do *pipeline* e comprovados em bancada. Tais resultados apresentados no 55º Congresso Brasileiro de Genética com o resumo intitulado "MicroRNA-mRNA Network Controlling the Promiscuous Gene Expression in the Thymus of NOD (Non Obese Diabetic) Mice: Implications in the Emergence of Type 1 Diabetes Mellitus".

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MORFOLÓGICA DE POPULAÇÕES DE *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) NO NORDESTE BRASILEIRO

Vanessa Bonatti

Orientador: Prof. Dr. Tiago Maurício Francoy

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/04/2012

A abelha *Melipona subnitida*, popularmente conhecida como jandaíra, é uma espécie endêmica do nordeste brasileiro, que possui distribuição em uma ampla gama de ambientes bastante diversificados pertencentes, principalmente ao bioma Caatinga. Estas abelhas apresentam grande importância para as populações locais por serem uma das espécies mais viáveis para criação, uma vez que se adaptam melhor às condições adversas do meio e são bastante promissoras quando multiplicadas, apresentando grande potencialidade para produção de mel e pólen, além de sua importância ecológica como polinizador. No entanto, essas abelhas encontram-se atualmente ameaçadas devido, em grande parte, à destruição de seu habitat e de seus ninhos naturais para coleta do mel. Apesar de sua relevância, estudos populacionais de espécies de meliponíneos ainda são muito escassos, assim como a urgência em se compreender a estrutura e a dinâmica de suas populações para o monitoramento e conservação de espécies. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade de *M. subnitida* em diferentes localidades do nordeste brasileiro através da morfometria geométrica das asas anteriores e sequenciamento de um fragmento do gene mitocondrial COI. Foram coletadas operárias de 95 colônias de Areia Branca - RN, Barreirinhas - MA, Parnaíba - PI, Fortaleza - CE, Jandaíra - RN e Mossoró - RN. Para análise do padrão de venação da asa foram utilizadas aproximadamente 10 operárias por colônia, sendo marcados 11 marcos anatômicos em cada asa. Os resultados demonstraram estruturação dos grupos com separação estatisticamente significativa ($\alpha < 0,0001$) exceto entre Areia Branca e Jandaíra. O teste de validação cruzada identificou corretamente 88,89% dos indivíduos dentro de suas respectivas áreas. As análises moleculares identificaram 11 haplótipos e presença de alto número de haplótipos exclusivos. A diversidade nucleotídica (π) de 0,00543 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,79. Tanto as distâncias

morfológicas, como os resultados moleculares indicam que a variabilidade entre as populações amostradas está relacionada tanto ao ambiente em que as amostras foram coletadas como com a distância geográfica entre tais localidades, indicando a existência de ecótipos localmente adaptados.

INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA1 EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM SUSPEITA DA SÍNDROME HEREDITÁRIA DO CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO

Nathalia Moreno Cury

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2012

Cerca de 10% dos casos de câncer de mama e/ou ovário são caracterizados como hereditários, onde a presença de mutações germinativas no gene de suscetibilidade BRCA1 aumenta o risco de desenvolver esses cânceres durante a vida da mulher. O BRCA1 é um gene supressor tumoral envolvido na resposta de danos ao DNA, controle do ciclo celular, na remodelação da cromatina, ubiquitinação e regulação da transcrição. O presente estudo tem como objetivo central caracterizar as mutações do gene BRCA1 associadas a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário (HBOC) em pacientes atendidos no Serviço de Aconselhamento Genético do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Os vinte e dois éxons codificantes do BRCA1 foram analisados utilizando o método de *High Resolution Melting* (HRM) para triagem de mutações pontuais, seguido pelo sequenciamento de DNA dos casos selecionados para validação. A técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) também foi usada para detectar grandes deleções e duplicações. Uma vez confirmada a mutação, membros da família considerados de alto risco, serão investigados para a mutação específica, a fim de proporcionar-lhes um aconselhamento genético apropriado para a detecção precoce do câncer. No presente estudo, foram investigados 41 pacientes que preencheram os critérios para o teste genético de acordo com NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2010. Um total de 21 mutações foram identificadas, duas das quais são patogênicas: a deleção dos éxons 17-18 e a deleção dos éxon 19. Ambas estão localizadas no domínio BRCT do gene BRCA1, essencial para a ligação de fosfoproteínas críticas para a ativação do complexo de reparo do DNA. Outra mutação, a S616del, foi tratada como patogênica, mas apresenta informações controversas em diferentes estudos. O trabalho também identificou uma nova mutação, Val1117Ile. Um estudo de haplótipos das mutações identificadas nos pacientes foi realizado e revelou que um dos haplótipos, denominado de 6, contendo quatro resíduos mutados (871Leu, 1038Gly, 1183Arg e 1613Gly) estava presente em 50% das pacientes. O estudo de associação com 82 indivíduos saudáveis, mostrou diferença significativa ($p=0,026$) nos pacientes, sugerindo assim um risco aumentado de HBOC. Adicionalmente, foi analisada a mutação germinativa R337H no gene p53 para os casos suspeitos de Síndrome de Li-Fraumeni. Em síntese, o presente estudo contribui com a identificação de uma nova mutação não-sinônima no gene BRCA1 e sugere que o haplótipo 871Leu-1038Gly-1183Arg-1613Gly possa conferir risco aumentado do câncer de mama e/ou ovário em pacientes diagnosticados com HBOC.

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS OBTIDAS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS *IN VITRO* EM SISTEMA DE CO-CULTIVO COM FIBROBLASTOS DE EMBRIÕES MURINOS

Everton de Brito Oliveira Costa

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2012

A hematopoese tem sido bem descrita em modelos murinos nas últimas décadas, contudo, trabalhos demonstrando os mecanismos da hematopoese em humanos ainda são escassos. A derivação da primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (CTEhs) em 1998, gerou novas perspectivas tanto para o estudo da hematopoese na tentativa de mimetizar o que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, quanto para a aplicação clínica das células hematopoéticas obtidas a partir da diferenciação dessas células. Contudo, apesar de inúmeros trabalhos terem demonstrado a obtenção de células hematopoéticas a partir de CTEhs, os protocolos têm gerado quantidades variáveis de células, com baixa eficiência e com propriedades funcionais de células primitivas. Desse modo, este trabalho procurou estabelecer um modelo próprio de diferenciação de CTEhs-H1 em células progenitoras hematopoéticas para que estas pudessem ser melhor caracterizadas e obtidas de forma mais eficiente. Para isto, foi desenvolvido um sistema de diferenciação baseado no co-cultivo da linhagem de CTEh-H1 com fibroblastos de embrião de camundongo (MEFs), em meio de diferenciação

suplementado soro fetal bovino (SFB) e citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos em baixas concentrações. Como resultado, o desenvolvimento do presente trabalho permitiu o estabelecimento de um método para geração de populações mistas de células enriquecidas em CPHs positivas para o marcador CD45, o qual mostrou ser coexpresso com outros marcadores hematopoéticos (CD31, CD43, CD71 e CD38), e células hematopoéticas maduras positivas para marcadores mielóide-específicos (235a, CD14, CD15, CD16) e com características morfológicas típicas. Foi demonstrado que as células obtidas expressavam genes relativos ao sistema hematopoético (*CD45*, *CD31*, *runx1*, *tal1*, *lmo2*, *prom1*, *CD34* e *notch1*), e possuíam potencial clonogênico in vitro da ordem de 1/574 células plaqueadas. Em adição, corroboramos os achados de que as células hematopoéticas apresentam duas origens distintas: a partir do endotélio hemogênico e a partir de células com propriedades hemangioblásticas independentes do endotélio hemogênico.

Ginecologia e Obstetrícia

UTILIDADE DA RELAÇÃO NEUTRÓFILO/LINFÓCITO, DO CA-125 E DA HISTÓRIA CLÍNICA NO DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRIOSE EM MULHERES COM DOR PÉLVICA CRÔNICA

Renata Marques Fabiani Daher

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira

Dissertação de Mestrado apresentada em 07/05/2012

A dor pélvica crônica é uma doença de significativa prevalência que afeta diretamente as mulheres em idade reprodutiva e a endometriose pode ser uma de suas etiologias.

Objetivo: Avaliar a relação neutrófilo/linfócito (N/L), a dosagem de CA-125 e história clínica no diagnóstico de endometriose em mulheres com dor pélvica crônica.

Metodologia: Estudo transversal, realizado com base no levantamento de prontuários médicos de mulheres com dor pélvica crônica avaliadas em ambulatório da FMRP-USP, de agosto de 1999 a janeiro de 2009, submetidas à laparoscopia e separadas pelo diagnóstico de endometriose, considerando a classificação pela ASRM 1996. 168 pacientes foram separadas em dois grupos: o grupo com diagnóstico laparoscópico de endometriose (N=111); e o grupo controle sem endometriose (N= 57). Análise estatística foi realizada utilizando-se o programa PASW 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Consideramos os valores de $p < 0,05$ como diferença significativa.

Resultados: As dosagens de CA-125 foram significativamente mais elevadas em mulheres com endometriose ($p < 0,01$), com moderada e significativa correlação entre o grau de endometriose e sua concentração sérica ($p < 0,01$). Não observamos diferença significativa entre os grupos em relação à variável N/L ($p = 0,75$). No cálculo das curvas ROC, observamos que a área sob a curva foi de 0,71 para o CA-125 (IC de 95% = 0,63-0,79, $p < 0,01$), enquanto para a relação N/L foi de apenas 0,48 (IC de 95% = 0,39-0,58, $p = 0,75$). Para diagnóstico de endometriose, em mulheres com dor pélvica crônica, a sensibilidade do CA-125 foi de 55% e especificidade de 80,7%. A prevalência de dismenorreia foi mais elevada nas mulheres com endometriose (80,18% vs. 47,37%, $p < 0,01$); e quando associada ao CA-125, a sensibilidade foi de 88,3% e especificidade de 40,4%.

Conclusões: Mulheres com DPC e endometriose têm mais dismenorreia e níveis séricos de CA-125 mais elevados do que mulheres com DPC sem endometriose. A relação N/L não apresentou diferença significativa entre os dois grupos de mulheres com DPC com e sem endometriose, não se mostrando um marcador capaz de facilitar o diagnóstico de endometriose. A associação de CA-125 e dismenorreia melhora a sensibilidade para o diagnóstico de endometriose em relação à utilização do marcador CA-125 isolado. Os níveis séricos de CA-125 mostraram correlação positiva com o grau de endometriose.

REPRODUTIBILIDADE DA MEDIDA DO VOLUME FETAL NO PRIMEIRO TRIMESTRE DA GESTAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

Daniela de Abreu Barra

Orientador: Prof. Dr. Francisco Mauad Filho

Tese de Doutorado apresentada em 01/06/2012

Objetivos: 1. Estimar e comparar a confiabilidade e concordância entre diferentes métodos de determinação do volume da cabeça e tronco fetal, utilizando o VOCAL e passo de rotação de 30°; 2. Estimar e comparar a confiabilidade e

concordância entre os passos de rotação de 30°, 15° e 9° utilizando apenas o método que apresentar os melhores resultados no item 1; 3. Estimar e comparar o tempo gasto nos métodos avaliados.

Métodos: Foram realizadas 3 avaliações (duas pelo primeiro observador intercaladas por uma do segundo observador) de maneira cega para determinação do volume fetal em 40 gestantes com feto único e com comprimento cabeça-nádega (CCN) entre 45 e 84 mm. Cada observador calculou o volume fetal delineando seu contorno de 3 formas: modo padronizado no plano A (rodando o feto sobre o menor eixo), modo padronizado no plano C (rodando o feto sobre o seu maior eixo) e modo não modificado, todos com passo de rotação de 30°. Definimos como modo não modificado (NM): a realização do contorno fetal em qualquer eixo de rotação (livre escolha: eixo longitudinal, transversal ou coronal) bastando apenas arrastar o ponto central para dentro do tórax fetal em apenas um deles. Definimos como modo padronizado (MP): feto posicionado de modo que o plano sagital fosse identificado no plano A, com a cabeça para esquerda; plano transversal identificado no plano B, com os membros para cima; e plano coronal identificado no plano C, com a cabeça para esquerda. Além disso, no plano A, o ponto central deveria estar localizado no tórax fetal, abaixo do coração, sendo possível traçar o CCN horizontalmente e passando pelo ponto central. Cada observador ainda determinou o volume fetal utilizando o método com melhor confiabilidade/concordância usando os passos de rotação de 15° e 9°. Teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para checar a distribuição das medidas. Erros sistematizados entre os métodos foi checado através do repeated measures ANOVA. Realizamos a comparação dos coeficientes de correlação intraclasse para avaliar a confiabilidade; avaliamos visualmente os gráficos de Bland-Altman e comparamos os intervalos onde se espera encontrar 95% das diferenças através do teste de Pitman para analisar a concordância. O tempo gasto para realização de cada exame foi comparado através de ANOVA. Consideramos $p < 0,05$ como significância estatística.

Resultados: A idade das gestantes participantes do estudo variou de 18 a 40 anos. A idade gestacional variou de 11,1 a 14 semanas, o CCN de 45,9 a 83,8 mm. Não observamos erros sistematizados entre os métodos. O modo padronizado rodando o feto sobre o seu maior eixo apresentou os melhores resultados tanto para confiabilidade intra- e inter-observador ($ICC = 0,981$) quanto para concordância. Utilizando este método, não observamos diferenças na confiabilidade e concordância ao se reduzir o passo de rotação para 15° ou 9°. A média de tempo gasto (em segundos) desde a abertura do bloco tridimensional até sua análise e arquivamento da imagem foi menor quando utilizamos o modo não padronizado ($41,30 \pm 11,23$ s) comparado aos padronizados delineando o feto em A e C ($65,78 \pm 16,81$ s, $p < 0,01$; $66,83 \pm 17,78$ s, $p < 0,01$), não havendo diferença significativa entre estes dois últimos. Ao reduzirmos o passo de rotação, houve um aumento progressivo e significativo do tempo gasto ($66,83 \pm 17,78$ s; $89,78 \pm 19,75$ s; $101,20 \pm 20,56$ s; 30°, 15° e 9° respectivamente).

Conclusão: Nossos achados mostram que a utilização de um método padronizado e relativamente rápido, permite a análise do volume fetal com boa confiabilidade e concordância.

ÁLCOOL E GESTAÇÃO: RASTREAMENTO DO CONSUMO DE ÁLCOOL ATRAVÉS DO AUDIT

José Renato Ferreira da Cunha

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2012

O uso de álcool, durante gestação, é um tema que vem levantando o interesse de pesquisadores ao redor do mundo. O ato de consumir álcool na gravidez envolve um grande risco, devido aos efeitos teratogênicos do álcool sobre o feto. Este estudo teve como objetivo principal avaliar e comparar a ingestão alcoólica entre gestantes e mulheres não grávidas. Foi realizado um estudo observacional analítico do tipo transversal, com 177 mulheres atendidas na Estratégia de Saúde da Família do município de Araraquara-SP. O Alcohol Use Disorders Identification Test - AUDIT foi o instrumento aplicado para avaliar o consumo de álcool entre as participantes do estudo. Os dados foram analisados através de estatística descritiva, e, para a análise estatística, utilizaram-se o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fischer, sendo adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Após a aplicação do teste, os resultados do estudo indicaram os Níveis de Risco do AUDIT entre não gestantes que foram: Consumo de Baixo Risco (0 a 5 pontos) 84,3%; Uso de Risco (6 a 15 pontos) 11,4%; Uso Nocivo (16 a 19) 1,4% e Provável Dependência (?20) 2,9%. Para as gestantes, os Níveis de Risco encontrados foram: Consumo de Baixo Risco (0 a 1 ponto) 75,7% e Uso de Risco (?2) 24,3%. Para comparar o consumo de álcool, entre as não gestantes e as gestantes, optou-se por adotar o mesmo escore nos dois grupos, isto é, nota de corte no AUDIT ?2 para determinação do Uso de Risco. A prevalência do Uso de Risco de álcool foi de 37,1% para as mulheres não gestantes e 24,3% para as gestantes, e não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos. A prevalência no Uso de Risco de álcool, no primeiro trimestre, foi de 25,7%, no segundo trimestre, foi de 25,0% e, no terceiro trimestre, foi de 22,0%, e não houve diferença estatística significativa entre os três grupos. Concluindo, não houve diferença no Uso de Risco de álcool entre as não gestantes e gestantes, e nem entre as gestantes, nos três trimestres de gravidez. Observou-se, no entanto, uma tendência à redução no Uso de Risco de álcool após as mulheres terem engravidado e no terceiro trimestre gestacional.

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO SEXUAL E DO HUMOR E VIVÊNCIA DE MULHERES COM DOR PÉLVICA CRÔNICA

Adriana Peterson Mariano Salata Romão

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira

Tese de Doutorado apresentada em 11/06/2012

Introdução: Dor Pélvica Crônica (DPC) é definida como dor pélvica não exclusivamente menstrual, com duração de pelo menos seis meses, suficientemente intensa que pode interferir em atividades habituais, necessitando de tratamento clínico e/ou cirúrgico.

A DPC é um diagnóstico sindrômico comum e complexo, muitas vezes de causa não identificada. É uma condição que pode comprometer todas as fases da resposta sexual e causar distress à mulher prejudicando sua qualidade de vida.

Objetivo: Avaliar a prevalência de disfunção sexual em mulheres com DPC e conhecer a vivência destas em relação à dor pélvica crônica.

Pacientes e Método: Para análise qualitativa foram utilizados os instrumentos Female Sexual Function Index (FSFI), Inventário de Depressão de Beck (Beck). A análise dos instrumentos foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelos autores nas versões em português. Para a análise comparativa dos escores foi utilizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Para análise comparativa das variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher ou teste χ^2 entre grupos independentes. Para correlação entre as variáveis do estudo foi utilizado o teste de Spearman. Para todas as comparações foram consideradas significativas as diferenças para $p < 0,05$. Para análise qualitativa foi realizada entrevista com grupo focal e optou-se pela realização da análise de conteúdo de Bardin para análise das falas das mulheres com DPC.

Resultados: Este estudo encontrou 84,4% das mulheres com risco elevado para disfunção sexual; a comparação dos escores de FSFI mostrou que a função sexual nos domínios lubrificação, orgasmo e dor foram significativamente diferentes das mulheres sem DPC. Em relação à depressão a prevalência encontrada neste estudo foi de 38,9% nas mulheres com dor e 3,3% nas mulheres do grupo controle. Em relação à análise qualitativa os temas mais abordados na entrevista foram: sobre o diagnóstico, início da dor, o que piora e o que melhora relacionamento conjugal e interpessoal, interferência nas atividades cotidianas, associação da dor com aspectos emocionais e perspectivas para o futuro.

Conclusão: Os achados demonstram a importância de uma abordagem específica no tratamento da depressão e da disfunção sexual além do tratamento clínico, objetivando a melhora da qualidade de vida destas mulheres. É preciso dar ênfase também ao atendimento interdisciplinar considerando suas manifestações físicas, sociais, emocionais, relacionais e sexuais. A avaliação e o acompanhamento psicológico e sexual podem ser considerados como um dos fatores importantes no manejo da DPC podendo minimizar os impactos causados pela doença, auxiliando no enfrentamento dos sintomas.

IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD44+/CD24- E ALDH+ NOS DIVERSOS ESTÁDIOS DO CARCINOMA DE MAMA

Fernando Antonio Mourão Valejo

Orientador: Daniel Guimarães Tiézzi

Tese de Doutorado apresentada em 27/06/2012

Evidências crescentes apóiam a presença de células tronco tumorais (câncer stem-like cells - CSLCs) nos carcinomas de mama. Um grupo de células com características de células tronco nos tumores mamários pode ser identificada por citometria de fluxo. Tem sido descrito que essa subpopulação celular é responsável pela resistência tumoral ao tratamento e pela formação da metástase. No entanto, a análise desta população nunca foi realizada durante a progressão do câncer de mama.

Pacientes e Métodos: Foram incluídas prospectivamente 99 pacientes (mediana da idade = 57 anos) para avaliar a presença de células com características de células tronco dentro do tumor primário, utilizando análise em citometria de fluxo. Foram excluídos da análise um paciente do sexo masculino, as pacientes com carcinoma de histologia não ductal e as pacientes cujas amostras não puderam ser analisadas, sendo 79 amostras tumorais incluídas. Cinco pacientes pertenciam ao estágio 0 (DCIS palpável), 11 estágio I, 24 estágio II com linfonodos negativos (II-), 14 estágio II com linfonodos positivos (II+), 21 estágio III e 4 estágio IV. Além disso, dez linfonodos axilares com metástases de pacientes foram analisados. A porcentagem de células CD44+/CD24- e ALDH+, no grupo de células ESA+ foram determinados por citometria de fluxo em amostra de tecido tumoral fresco, após digestão tecidual. A relação entre a análise por citometria de fluxo e os

aspectos clínicos e patológicos foram analisados.

Resultados: A mediana da porcentagem de células CD44+/CD24- dentro da subpopulação ESA+ foi de 0,07% no estágio 0, 2,34% no estágio I, 0,65% no estágio II axila-, 8,19% no estágio II axila+, 0,49% no estágio III e 1,23% no estágio IV ($p = 0,0259$). Não foi estatisticamente significativa a variação da mediana da porcentagem de células ALDH+ quando relacionada aos estágios clínicos ($p = 0,3101$). A porcentagem mediana das células ESA+/CD44+/CD24- nos linfonodos axilares analisados foi 4,7%. Nós não observamos nenhuma associação entre a expressão de ALDH+ (ALDEFLUOR®) e o grau histológico, os receptores de estrogênio e os receptores de progesterona. O percentual mediano de células CD44+/CD24- foi maior (2,2% vs 0,41%) em tumores RE positivo ($p = 0,0161$). Não houve correlação entre os marcadores estudados com a idade das pacientes e com diâmetro clínico do tumor. Não houve correlação entre a marcação ESA+/CD44+/CD24- e a marcação ESA+/ALDH+ nas amostras analisadas (Índice de correlação $r = 0,10933$, $p = 0,5652$).

Conclusões: Observamos um padrão de comportamento das células ESA+/CD44+/CD24- na progressão do tumor de mama, com aumento progressivo dessas células até o estágio II axila + com posterior decréscimo. Observamos ainda não haver correlação na taxa de células ESA+/CD44+/CD24- e ESA+/ALDH+. Esses achados acrescentam importantes informações aos já conhecidos modelos de geração tumoral colaborando no sentido de orientar futuras pesquisas.

Imunologia Básica e Aplicada

O EFEITO IMMUNOMODULADOR DA LECTINA ARTINM DESENCADEADO PELA INTERAÇÃO COM O RECEPTOR TLR2

Vânia Sammartino Mariano

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Tese de Doutorado apresentada em 19/04/2012

Demonstrou-se anteriormente que ArtinM, uma lectina ligante de D-manose obtida de sementes de *Artocarpus heterophyllus*, induz a produção de interleucina (IL)-12 por macrófagos e células dendríticas, favorecendo o desenvolvimento de imunidade do tipo T helper (Th)1, eficiente contra patógenos intracelulares. Quando administrada a camundongos experimentalmente infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, ArtinM induziu resposta Th1, que levou à regressão da doença fúngica. Esse efeito mostrou-se dependente da produção de IL-12 e da expressão de receptor 2 do tipo toll (TLR2) por fagócitos. As descrições de que TLR2 e 4 participam de respostas antifúngicas e de que o ectodomínio desses receptores apresentam sítios de N-glicosilação foram importantes para que conduzíssemos o presente estudo, delineado no sentido de caracterizar a interação de ArtinM com TLR2 e a participação de correceptores e moléculas acessórias nessa interação.

A suposição de que o efeito de ArtinM fosse atribuível a sua interação direta com N-glicanas de TLRs foi examinada através de ensaios do tipo “gene reporter” em células HEK293 transfectadas com genes de TLRs, associados a moléculas acessórias, bem como com NF- κ B associado à luciferase. Em células que haviam sido transfectadas com TLR2 ou com os heterodímeros TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6, associados a moléculas acessórias, o estímulo com ArtinM resultou em ativação de NF- κ B e detecção de atividade luciferase. Por outro lado, células transfectadas com TLR4, também associado a moléculas acessórias, não foram ativadas por ArtinM. Quanto ao papel exercido por moléculas acessórias, constatou-se que a ausência de expressão de CD36 resultou em queda da ativação celular determinada por ArtinM.

Macrófagos esplênicos murinos, sob estímulo de ArtinM, tiveram aumentada a expressão de TLR2 e a produção das citocinas IL-12p40, IL-6, TNF- α e IL-10. Essa produção sofreu queda significativa quando macrófagos de camundongos nocauteados para TLR2 foram ensaiados; exceto a produção de TNF- α , que foi significativamente maior nos nocauteados do que nos WT.

Os macrófagos murinos foram ainda utilizados para avaliar se ArtinM poderia atuar sobre o receptor de α -glucanas, dectina-1. O estímulo com ArtinM resultou em aumento de aproximadamente 10 vezes os transcritos para dectina-1 e para IL-23. Por outro lado, o bloqueio de dectina-1, promovido pela ligação à laminarina, não alterou a produção de citocinas estimuladas por ArtinM.

Nossos resultados indicam que ArtinM, ao reconhecer N-glicanas do ectodomínio de TLR2, atue como um agonista desse receptor. A plena eficiência desse papel se dá quando há expressão concomitante da molécula acessória CD36. O desencadeamento de respostas Th1 e Th17 pelo estímulo com ArtinM pode ser responsável pelo efeito benéfico exercido pela administração da lectina em infecção fúngica, expandindo suas potenciais aplicações como molécula imunomoduladora.

LEUCOTRIENO B₄ NA SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR *Histoplasma capsulatum*

Adriana Secatto

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Tese de Doutorado apresentada em 27/04/2012

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico, patogênico e responsável pela histoplasmose, doença que pode levar às lesões pulmonares, caracterizada pelo acúmulo de leucócitos ao redor do fungo, resultando na formação de granulomas. A infecção ocorre principalmente pela inalação de conídios ou pequenos fragmentos de micélio que atingem os alvéolos pulmonares, onde se transformam em leveduras, que é a forma patogênica do fungo. Nos últimos anos, estudos referentes à função de leucotrienos (LTs) restringem-se não apenas à participação destes como mediadores da resposta inflamatória, mas também como substâncias capazes de modular a síntese e liberação de citocinas, mecanismos efetores dos fagócitos e, conseqüentemente a resposta imune. Recentemente, demonstramos que altas quantidades de LTB₄ e LTC₄ são produzidas no pulmão de animais infectados com *H. capsulatum*, e que estes mediadores têm importante papel na proteção do hospedeiro, pois aumentam a atividade fagocítica dos macrófagos, a produção de óxido e a proliferação e recrutamento de células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras para local da infecção. No presente trabalho, nós demonstramos o papel fundamental do LTB₄ nos mecanismos de resistência e suscetibilidade à infecção pelo fungo. Os resultados obtidos demonstram que a resistência à infecção por *H. capsulatum* esta associada à maior produção de LTB₄ e da expressão de seu receptor nos macrófagos. Além disso, demonstramos que camundongos da linhagem suscetível (C57BL/6) tem menor expressão da enzima 5-LO no pulmão, menor capacidade fagocítica e microbicida do que os animais da linhagem resistente (sv129). Nossos resultados sugerem que a resistência ou suscetibilidade na histoplasmose pode estar associada à maior produção de LTB₄ e expressão diferencial de BLT1.

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS 3-FENILCUMARÍNICOS NO METABOLISMO OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ESTIMULADOS POR COMPLEXOS IMUNES

Micássio Fernandes de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2012

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos neutrófilos, que representa um mecanismo essencial da imunidade inata contra agentes infecciosos, pode ser desencadeada por imunocomplexos (IC) associados ou não com componentes do sistema complemento. Os IC são normalmente eliminados da circulação pela ligação aos receptores de complemento do tipo 1 em eritrócitos, que os transportam até o baço e o fígado, onde são fagocitados por macrófagos residentes. Porém, defeitos neste mecanismo de eliminação podem levar à deposição de IC nos vasos e tecidos. Em algumas doenças inflamatórias, onde ocorre uma intensa deposição de IC, pode acontecer o recrutamento e a ativação maciça de neutrófilos pelos IC. Nessa situação, os mecanismos endógenos de defesa tecidual não conseguem controlar as alterações desencadeadas pelos fatores oxidantes e líticos liberados pelos neutrófilos, levando à possível lesão tecidual e conseqüências funcionais e estruturais para o organismo. Nessa perspectiva, tem-se intensificado, nos últimos anos, a procura por novos compostos terapêuticos com capacidade de reduzir os danos aos tecidos adjacentes ao acúmulo de IC, neutrófilos, ERO e enzimas líticas, expostos a níveis deletérios desses componentes. Assim, neste trabalho foi avaliado o potencial antioxidante de um conjunto de dez derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por IC, empregando-se o ensaio de quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina (QLlum e QLluc, respectivamente). Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade das amostras, através do ensaio de exclusão do azul de tripan e medida da atividade da lactato desidrogenase liberada, bem como sua capacidade de sequestrar HOCl e inibir a atividade das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO). Observou-se que todas as amostras avaliadas inibiram a QLlum e a QLluc, sendo que cinco delas tiveram efeito inibitório maior que ou igual a 50% (C6, C13, C13a, C24 e C24a)*. Este efeito biológico não foi mediado pela citotoxicidade das 3-fenilcumarinas, nas condições avaliadas. Dentre essas amostras, o derivado 3-fenilcumarínico C13, que foi o mais efetivo em inibir a QLluc, possui duas características que parecem estar relacionadas com tal efeito: um grupo substituinte orto-diidróxi no esqueleto cumarínico e um grupo

metilenodioxila no anel fenílico. Além do mais, todas as substâncias que possuem o grupo metilenodioxila no anel fenílico (C1, C6, C6a, C13, C13a) apresentaram efeito inibitório da QLLuc maior que as respectivas análogas sem este substituinte (C15, C18, C18a, C24, C24a). A inibição da QLLuc parece ser independente da inibição da atividade da NADPH oxidase, visto que as substâncias apresentaram efeito inibitório discreto no consumo de O₂ pelos neutrófilos estimulados por IC. Por outro lado, as amostras C13 e C24, que têm em comum a presença do grupo substituinte 6,7-diidroxi, apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre a QLLum, apresentando IC₅₀ semelhante. Essas duas substâncias também foram as mais ativas em inibir a atividade da enzima MPO e em sequestrar o HOCl. Para esses dois ensaios, a atividade biológica observada foi dependente do número de hidroxilas na estrutura do derivado 3-fenilcumarínico. Os resultados deste trabalho mostram que a atividade antioxidante dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos está relacionada às características estruturais dessas moléculas. Dentre a série de substâncias avaliadas, C13 e C24 são as amostras mais promissoras para uso como protótipos de moléculas com aplicação terapêutica na modulação desta função neutrofílica.

EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO METOTREXATO NA ARTRITE REUMATÓIDE DEPENDE DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS CD39⁺?

Raphael Sanches Peres

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada em 10/05/2012

Introdução: Artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por uma inflamação crônica das articulações. A estratégia terapêutica mais utilizada na AR consiste no uso de doses baixas de Metotrexato (MTX), um antagonista do folato, que promove a manutenção de altos níveis de adenosina (ADO) extracelular. No entanto, uma parte considerável dos pacientes é refratária ao tratamento com MTX e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não é estabelecido. Estudos demonstram que células Tregs expressam em suas superfícies as ectonucleotidases CD39/ENTPD1 e CD73/ecto-5 'nucleotidase, enzimas que geram ADO através da degradação de ATP. Estes achados, associados ao fato que a ADO possui potente atividade imunomoduladora, sugere que a atividade antiinflamatória do MTX está relacionada com os efeitos das Tregs.

Objetivos: Investigar se os mecanismos de refratariedade ao MTX em pacientes com AR podem estar relacionados com uma deficiência na atividade bioquímica e função supressora de células Tregs, focando principalmente na expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73.

Pacientes e Métodos: No presente estudo, amostras do sangue periférico de pacientes com AR (n= 89) e doadores saudáveis (n=16) foram coletadas. Por citometria de fluxo, as populações leucocitárias de PBMC foram fenotipadas para a avaliação da expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 nos diferentes tipos celulares. A atividade das ectonucleotidases em células TCD4⁺ na geração de ADO extracelular foi avaliada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e ensaios colorimétricos de Verde Malaquita.

Resultados: Citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α presentes no plasma e a frequência de células TCD4⁺ produtoras de IL-17 e IFN- γ estavam significativamente aumentadas em pacientes não responsivos ao MTX (UR-MTX; DAS28-5,87 \pm 0,52; média de idade- 54,7 anos) quando comparadas com pacientes responsivos (R-MTX; DAS28- 2,23 \pm 0,57; média de idade- 52,6 anos) e indivíduos saudáveis (IS). Na caracterização fenotípica dos leucócitos de PBMC, não houve diferença na porcentagem de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, células B e células dendríticas entre os grupos analisados. No entanto, observamos um aumento significativo na porcentagem de células Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) em pacientes R-MTX. De maneira interessante, enquanto que a porcentagem de células Tregs expressando CD73 não estava alterada, observou-se um aumento da frequência desta população celular expressando CD39 em pacientes R-MTX. Adicionalmente, a ADO extracelular presente no sobrenadante de células Tregs de pacientes UR-MTX estava reduzida quando comparada aos outros grupos, visto que esse grupo de pacientes também apresenta uma expressão reduzida de CD39 na superfície das Tregs.

Conclusão: Em conjunto estes resultados demonstram que a refratariedade de pacientes ao MTX é associada com o número e funções das Tregs, especialmente na geração de ADO extracelular. Esses achados podem gerar novas perspectivas em intervenções terapêuticas para tratamento da AR, proporcionando avanços na escolha de drogas rotineiramente utilizadas para tratar a doença.

ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR PROTEÍNAS DE MICRONEMAS DE *TOXOPLASMA GONDII* É MEDIADA PELA INTERAÇÃO COM RECEPTORES DO TIPO *TOLL*

Aline Sardinha da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 11/05/2012

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídio intracelular obrigatório conhecido por sua habilidade em parasitar uma ampla gama de espécies hospedeiras. A região apical do parasito é rica em organelas que, em função dos produtos liberados, estão envolvidas no processo de adesão e invasão da célula hospedeira. As proteínas liberadas por micronemas (MICs), solúveis e transmembrana, possuem domínios adesivos essenciais para a virulência do parasita. Algumas dessas proteínas são encontradas associadas entre si na superfície do taquizoíta, formando complexos como *TgMIC1/MIC4/MIC6* e *TgMIC3/MIC8*. Em estudos anteriores demonstramos a que o subcomplexo *TgMIC1/MIC4* (Fração LAC+) liga-se à lactose e estimula macrófagos a secretar IL-12. Verificamos, utilizando células HEK293 transfectadas, que um dos principais mecanismos responsáveis pela produção de IL-12 decorria do reconhecimento de N-glicanos do ectodomínio de TLR2 pelo domínio de reconhecimento de carboidrato de *TgMIC1*. O objetivo do presente estudo foi o de investigar a capacidade de *TgMIC1* e *TgMIC4* de ativar macrófagos murinos e qual o papel desempenhado por TLR2 e/ou TLR4 no desencadeamento dessa ativação. Mostramos que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57Bl/6, estimulados com *TgMIC1* e *TgMIC4*, utilizadas isoladamente ou em combinação, secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β , produzem altos níveis de óxido nítrico, e têm aumentadas suas capacidades migratória e fagocítica. Os ensaios que utilizaram macrófagos de camundongos C57Bl/6 nocauteados revelaram que a ausência de expressão de TLR2 ou de TLR4 prejudicou os efeitos ativadores exercidos por *TgMIC1* e *TgMIC4*. Macrófagos TLR2^{-/-} tiveram as manifestações de ativação celular significativamente reduzidas em relação aos macrófagos selvagens. Por outro lado, esses efeitos foram mais afetados pela ausência de TLR4, uma vez que as respostas obtidas frente ao estímulo com *TgMIC1* ou *TgMIC4* eram similares às verificadas em células não estimuladas (controle negativo). Concluímos que *TgMIC1* e *TgMIC4* interagem com os receptores do tipo *toll* 2 e 4 expressos por macrófagos, levando à ativação celular manifesta por alta produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, e aumento das capacidades migratória e fagocítica. A interação com TLR4 é preponderante em relação à estabelecida com TLR2 no desencadeamento de ativação celular.

ANÁLISE IMUNOENDOCRINOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR DE DPP-4 NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 EXPERIMENTAL

Mariana Rodrigues Davanzo

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2012

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. Existem diversas formas de tratamento do DM1, tais como administração de insulina, imunossuppressores, transplantes de pâncreas ou ilhotas pancreáticas, porém todos se mostram ineficientes em algum aspecto. Recentemente, uma nova classe de medicamentos, os inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (iDPP-4), demonstrou eficiência terapêutica e segurança no tratamento de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 por via oral devido ao aumento do hormônio peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1, do inglês glucagon-like peptide-1). Além disso, o uso de inibidores de DPP-4 em modelos experimentais de DM1 tendem a mostrar proteção das células β pancreáticas contra apoptose, estimulação de neogênese de ilhotas pancreáticas e melhora do controle homeostático da glicose. Esse presente projeto teve como objetivo avaliar o perfil imunológico e endocrinológico da administração do inibidor de DPP-4 (MK0431) em DM1 experimental quimicamente induzido por estreptozotocina em camundongos C57Bl/6. Os animais diabéticos foram tratados com ração controle ou ração contendo inibidor de DPP-4 (4g MK0431/Kg de ração) ad libitum durante 30 e 90 dias. Durante o tratamento os animais tiveram glicemia, peso e teste de tolerância oral à glicose avaliados. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o sangue, baço, timo, linfonodos pancreáticos e pâncreas foram coletados. Após 30 dias de tratamento com inibidor, foi observado um aumento do hormônio GLP-1 no soro, além de um padrão imunológico favorável. Dentre os mecanismos imunológicos, foi possível observar um aumento de células T reguladoras (TCD4+CD25+Foxp3+) no baço e uma diminuição da citocina IFN- γ no homogenato pancreático. Após 90 dias de tratamento com inibidor, também foi detectado um aumento de insulina e GLP-1 séricos e uma diminuição nos níveis glicêmicos dos animais tratados. Observou-se uma redução no padrão inflamatório no microambiente pancreático, caracterizado pela diminuição das citocinas TNF- α e IFN- γ no homogenato pancreático e por uma diminuição da frequência de macrófagos CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos. Os resultados obtidos neste projeto contribuíram para validar a eficácia

terapêutica da administração de inibidor de DPP-4 no tratamento do DM1 experimental, bem como os mecanismos imunológicos e endocrinológicos envolvidos. Sem a ocorrência de efeitos tóxicos relevantes, o uso de inibidores de DPP-4 pode se tornar uma alternativa terapêutica para o tratamento do DM1 em humanos, que constitui uma doença associada à baixa qualidade de vida em longo prazo e necessidade de tratamento crônico de alto custo.

RECEPTOR DE AEROBACTINA FÉRRICA DE *ESCHERICHIA COLI* – IutA: UM NOVO ANTÍGENO TINDEPENDENTE DO TIPO 1

Taise Natali Landgraf

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo

Dissertação de Mestrado apresentada em 15/06/2012

Alguns fatores de virulência em bactérias de microbiota normal, tais como sideróforos – moléculas captadoras de ferro – e determinadas fímbrias, possibilitam que esses micro-organismos causem infecção quando a colonização ocorre fora de seu habitat normal. Dentre as diferentes espécies bacterianas da microbiota normal com potencial para causar doenças, como as infecções do trato urinário (ITUs), destaca-se *Escherichia coli*. Certas cepas dessa espécie bacteriana apresentam um plasmídeo (pColV) que contém um gene que codifica IutA, o receptor para a aerobactina férrica, que é um sideróforo frequentemente associado às ITUs. Recentemente, nosso grupo estabeleceu que IutA apresenta a capacidade de induzir proliferação de linfócitos B. Neste trabalho, objetivamos identificar as moléculas e os mecanismos que modulam a proliferação de linfócitos B induzida por IutA recombinante (rIutA) de *E. coli*. Para avaliar se a proliferação era dependente de outras células, foram realizados ensaios de proliferação de células B marcadas com CFSE utilizando o sobrenadante de macrófagos ou células dendríticas estimulados com rIutA, por 24 horas, ou coculturas em placas de *transwell*. As análises desses ensaios revelaram que a proliferação das células B induzida por rIutA é dependente de moléculas liberadas por células acessórias, ou seja, ocorre de forma indireta. Os resultados dos ensaios utilizando células deficientes da molécula adaptadora MyD88 mostraram dependência da sinalização por essa molécula nos linfócitos B, mas não nas células acessórias, para que ocorresse a proliferação. Posteriormente, os ensaios *in vitro* utilizando células de animais deficientes para TLR4, TLR2 e IL-33R mostraram que a sinalização por esses receptores é dispensável. Contrariamente, a utilização do antagonista do receptor de IL-1 reduziu significativamente a proliferação de células B tratadas com esse antagonista. Além disso, identificamos que rIutA leva à expressão de IL-1 em macrófagos e células dendríticas estimuladas com essa proteína. Assim, nossos resultados sugerem que rIutA de *E. coli* induz a proliferação policlonal de linfócitos B de maneira independente de células T, por um mecanismo mediado por células acessórias, como macrófagos e células dendríticas. Embora não identifiquemos o receptor macrófágico ou das células dendríticas a qual rIutA se liga, sugerimos que a ação de rIutA sobre essas células induz a produção de IL-1 que age sobre seu receptor em células B, induzindo-as a proliferação. Esses resultados abrem perspectivas de estudo de IutA como molécula estimuladora do tecido linfóide associado a mucosa, assim como evasina de *E. coli* patogênicas.

Neurologia

AÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A PLASTICIDADE NEURAL

Maurício Benedetti

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimaraes

Tese de Doutorado apresentada em 24/04/2012

A dor neuropática pode ser secundária a doenças ou traumas que acometem o sistema nervoso central ou periférico, geralmente e de difícil tratamento e resistente a analgésicos simples. O indivíduo acometido pela dor neuropática pode apresentar alterações físicas e emocionais que promovem uma diminuição importante da sua qualidade de vida. A dor neuropática ocasiona danos não só apenas para o indivíduo, mas também para a sociedade devido aos elevados custos de tratamento e ao afastamento do trabalho que pode ser parcial ou até mesmo podendo levar a aposentadoria por invalidez. O exercício físico exerce um efeito crucial na recuperação da atividade neuronal após lesão do sistema nervoso, recuperando, dramaticamente, a atividade motora. A ação da atividade física sobre a recuperação do sistema sensorial e ainda pouco conhecida, particularmente, os mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelo sistema motor. A atividade física persistente provoca alterações dramáticas nos níveis de RNAm e/ou de proteínas não somente nas fibras musculares, mas

também em populações celulares específicas do sistema nervoso central e periférico. O entendimento de como o treinamento físico influencia, seletivamente, a atividade de um único gene é ainda limitada e, na maioria das vezes, se restringe à regulação do controle transcricional. MicroRNAs (miRNAs) representam uma nova classe de RNAs não-codificadores (ncRNA) que agem como potentes reguladores da expressão de diversos genes em tecidos específicos e em condições determinadas. A identificação e caracterização da ação de miRNAs tem oferecido uma visão completamente nova dos mecanismos de regulação pós-transcricional, influenciando diversos mecanismos celulares como diferenciação, crescimento, apoptose, metabolismo e atividade sinéptica. Os miRNAs, miRNA-1, miRNA-16, miRNA-206 parecem estar envolvidos na regulação da expressão de BDNF (Brain derived neurotrophic factor), um fator neurotrófico da família das neurotrofinas que é afetado pela atividade física e pode atuar modulando a resposta ao estímulo doloroso. Este projeto investigou o efeito da atividade física sobre a expressão destes miRNAs no músculo soleo, no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal e ventral da medula espinhal bem como o efeito do destreinamento sobre este perfil de expressão. Investigamos também os efeitos da atividade física (nado forçado) na recuperação da alodinia e sobre a plasticidade neural induzida pela lesão de nervo periférico bem como os mecanismos neurobiológicos ativados pelo treinamento físico em modelo experimental. Este projeto combinou métodos de biologia celular e molecular com paradigmas comportamentais a fim de investigar os mecanismos neurobiológicos que contribuam para o entendimento do efeito das atividades físicas sobre a recuperação de alterações sensoriais após lesão do nervo periférico. Demonstrou-se que exercícios físicos crônicos, rítmicos podem desencadear respostas únicas no sistema nervoso periférico e central, oferecendo uma alternativa natural e não invasiva de ativação de moléculas com grande potencial terapêutico.

ADAPTAÇÃO TRANSCULTURAL E PROPRIEDADES PSICOMÉTRICAS DO SUBTESTE VISUAL REPRODUCTION (REPRODUÇÃO VISUAL I E II) DA WECHSLER MEMORY SCALE - FOURTH EDITION (WMS-IV), (ESCALAS DE MEMÓRIA DE WECHSLER) PARA UMA POPULAÇÃO DO BRASIL

Carina Tellaroli Spedo

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2012

O presente estudo tem por objetivo adaptar o subteste Reprodução Visual I e II da *Wechsler Memory Scale - IV* (WMS-IV), (Escala de Memória de Wechsler) para a língua portuguesa. Esta versão da WMS-IV é uma revisão da WMS-III, cujos estudos resultaram em modificações ou exclusões de alguns subtestes. O subteste Reprodução Visual, da WMS-IV sofreu alterações metodológicas e de conteúdo, no sentido de facilitar a análise dos resultados, bem como o tempo de aplicação. O subteste é subdividido em três domínios da memória visual (memória imediata, memória tardia e reconhecimento) e uma tarefa opcional para avaliação da percepção visual (cópia). A conversão dos escores brutos em escores ponderados e porcentagens cumulativas possibilitam a avaliação escalonada dos itens. Assim, é possível analisar qualitativamente, verificando-se a evocação imediata e o benefício do uso de pistas, o quanto a memória é eficaz quando comparada ao desempenho gráfico e, por fim, a capacidade de retenção do material visual aprendido (esquecimento). A adaptação do instrumento foi obtida transculturalmente. Para tanto, houve três tradutores, 24 juízes não especialistas que compuseram o estudo piloto, dois juízes especialistas e dois tradutores profissionais. O processo de análise das propriedades psicométricas utilizou a metodologia recomendada pelo *American Educational Research Association* [AERA], *American Psychological Association* [APA] e o *National Council on measurement in education* [NCME], 2008 - indicada pela editora Pearson - responsável pelos direitos autorais do WMS-IV. Fizeram parte desta etapa 90 sujeitos. As propriedades psicométricas evidenciaram que o processo de adaptação transcultural do instrumento foi viável e preencheu os critérios de equivalência entre a versão original e a ora obtida para uso corrente no Brasil.

LIMITE DE DOR A PRESSÃO, IMPACTO E QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA À SAÚDE EM CRIANÇAS COM MIGRÂNEA

Gabriela Natália Ferracini

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/04/2012

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o limite de dor a pressão (LDP) em crianças com migrânea, o impacto da cefaleia e a qualidade de vida relacionada à saúde.

Métodos: Compuseram a amostra 50 crianças com migrânea sem aura de ambos os gêneros de 6 a 12 anos de idade que estavam em atendimento no Ambulatório de Cefaleia Infantil e 50 crianças sem diagnóstico de migrânea ou outro tipo de cefaleia há pelo menos 3 meses que estavam em acompanhamento no Ambulatório de Problemas de Crescimento e Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em 2010 e 2011. O LDP foi avaliado com a utilização de um algômetro digital em 9 pontos anatômicos bilaterais (total 18), determinados pelo Colégio Americano de Reumatologia. Para verificação do impacto da cefaleia na vida destas crianças foi aplicado o questionário PedMIDAS (*Pediatric Migraine Disability Score*) e para qualidade de vida relacionada a saúde foi aplicado o questionário PedsQL4.0 (*Pediatric Quality of Life InventoryTM*) nas crianças e nos pais. Na análise estatística foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) e o coeficiente de correlação de Sperman (ρ).

Resultados: Os resultados mostram que em se somando todas as regiões corporais avaliadas, não foi possível detectar diferença do LDP entre as crianças com migrânea e as do grupo controle. Entretanto quando os grupos foram discriminados pelo gênero, tanto as garotas quanto os garotos com migrânea apresentam LDP baixo em pelo menos uma região avaliada, do que os garotos e garotas sem cefaleia. O LDP foi baixo em um ponto cefálico (musculatura suboccipital) e um ponto extracefálico (aspecto anterior de C5-C7) nas crianças com migrânea. O ponto cefálico obteve LDP baixo em relação aos pontos extracefálicos, em ambos os grupos, exceto a região de segundo espaço intercostal. A cefaleia interfere nas atividades diárias, principalmente escolar, das crianças com migrânea, independente do gênero. E a qualidade de vida relacionada à saúde não se apresentou pior em crianças com migrânea comparadas com as sem cefaleia, pela percepção das crianças. Mas pela percepção dos pais, a qualidade de vida relacionada à saúde é pior em crianças com migrânea. Nenhuma correlação foi encontrada entre: LDP e dias perdidos devido à cefaleia, LDP e qualidade de vida.

Conclusões: Este estudo demonstrou que a migrânea não está associada com dor muscular generalizada, mas que interfere nas atividades diárias, principalmente na escolar, independentemente do gênero. Pela percepção dos pais a qualidade de vida relacionada à saúde é pior em crianças com migrânea que nos controles.

ANÁLISE CRÍTICA DOS ASPECTOS COGNITIVOS, ADAPTATIVOS, DE SOBRECARGA, PSIQUIÁTRICOS E DE NEUROIMAGEM EM CRIANÇAS COM RETARDO MENTAL COM E SEM EPILEPSIA

Cecilia Souza Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Tese de Doutorado apresentada em 04/05/2012

A definição de Retardo Mental contempla uma abordagem multidimensional e baseia-se em três critérios: baixo funcionamento intelectual, dificuldades no comportamento adaptativo e condição de manifestação antes dos 18 anos de idade, podendo apresentar severidades e padrões distintos de capacidades e de limitações. O RM pode estar associado a crises convulsivas recorrentes e não provocadas caracterizando-se a síndrome epilética. Além disso, as crianças com RM com ou sem epilepsia podem ter risco aumentado de apresentarem transtornos psiquiátricos. Diante deste cenário, os cuidadores precisam lidar com as várias demandas decorrentes da própria doença e das limitações sociais e acadêmicas.

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo central comparar três grupos de crianças e adolescentes 1) com RM e epilepsia 2) com RM e sem epilepsia e 3) controle por meio da realização de testes e escalas.

Método: Foram analisadas prospectivamente 303 crianças e adolescentes no período de fevereiro de 2009 a agosto de 2011. Foram considerados aspectos de comportamento adaptativo, de habilidades diárias, de transtornos psiquiátricos, de sobrecarga dos cuidadores e de neuroimagem.

Resultados: As crianças com RM com e sem epilepsia tiveram como características clínicas e demográficas gestação pré-termo, parto com intercorrências, atraso no DNPM e estudar em escola especial. Quanto ao grupo de pacientes com RM e epilepsia identificou-se que as crianças com epilepsia e crises refratárias ao tratamento medicamentoso tiveram menor idade de início da epilepsia, utilizaram mais politerapia, tiveram mais síndromes e estudaram em escolas especiais. Crianças com RM e com epilepsia foi o grupo que teve mais prejuízos nos três comportamentos adaptativos avaliados (comunicação, socialização e habilidades diárias). A sobrecarga dos cuidadores foi mais elevada quando as crianças com RM com e sem epilepsia foram mais dependentes de seus cuidadores. Crianças com RM sem epilepsia tiveram mais problemas comportamentais gerais, internos e externos em relação às crianças com RM com epilepsia. Crianças com RM com e sem epilepsia tiveram alguns comportamentos caracterizados por impulsividade, perseveração, prejuízos no desenvolvimento e dependência. As principais alterações encontradas na Ressonância Magnética das crianças com RM (com e sem epilepsia) foram: atrofia subcortical, leucomalácia periventricular, esclerose mesial temporal e polimicrogiria. Partici-

pantes do grupo controle apresentaram maior espessura cortical e subcortical em diversas áreas da substância branca e substância cinzenta em relação aos dois grupos com RM.

Discussão: As crianças com RM reservam algumas características específicas sejam clínicas, demográficas ou comportamentais. Os transtornos psiquiátricos foram frequentes nas crianças com RM sem epilepsia. Contudo, nas crianças com RM e epilepsia, os aspectos psiquiátricos devem ser vistos com cautela, uma vez que, é preciso um nível cognitivo para que estes possam ser identificados e avaliados. Em adição, identificamos que o cuidar pode envolver outras características além da questão da sobrecarga. A clarificação de alguns destes aspectos poderão permitir que os profissionais da equipe multidisciplinar, pais e professores possam melhor compreender estas crianças para que sejam possíveis intervenções mais precisas e estimulações mais adequadas.

PADRÕES DE ATIVAÇÃO CEREBRAL EM MÚSICOS DURANTE UMA PERFORMANCE PIANÍSTICA ENVOLVENDO TÉCNICA OU EXPRESSIVIDADE: UM ESTUDO UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL (fMRI)

Marcia Kazue Kodama Higuchi

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Tese de Doutorado apresentada em 08/05/2012

Observações no aprendizado musical têm demonstrado fortes interações entre técnica e expressividade. Vários estudos utilizando neuroimagem têm sido realizados a fim de entender quais são as ativações neurais envolvidas na influência recíproca entre emoção e cognição em tarefas cognitivas simples. Entretanto, as correlações neurais subjacentes à interação entre técnica e expressividade na execução pianística - que requer integração de várias habilidades perceptuais, cognitivas, motoras e emocionais complexas - ainda são bastante desconhecidas. Portanto, este trabalho comparou as execuções pianísticas e os padrões de ativação cerebral em músicos durante performances pianísticas com a focalização atencional em atividades técnicas ou com a focalização atencional em atividades expressivas. Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte, investigamos o aspecto comportamental e na segunda parte o aspecto neurofisiológico. Na investigação comportamental, estudamos dois grupos de voluntários pianistas (um grupo de 9 profissionais e outro de 9 amadores), foram treinados a tocarem de memória um repertório pianístico a quatro mãos. Durante as sessões de treinamento, o repertório foi associado com a emoção de tristeza. Após o processo de treinamento, os pianistas passaram por uma sessão de gravação nos quais eles executaram a música em duas condições distintas. Na primeira condição denominada performance cognitiva, os pianistas foram instruídos a tocarem com o foco atencional em aspectos cognitivos. Na segunda condição denominada performance afetiva, os pianistas executaram o repertório direcionando toda a atenção no sentimento de tristeza que a música transmitia. Essas gravações foram utilizadas nos cinco experimentos realizados neste projeto. No primeiro experimento, foram selecionadas quatro gravações de cada pianista (2 cognitivas e 2 afetivas) do grupo de pianistas profissionais. No segundo experimento foram selecionadas duas gravações de cada pianista (1 cognitiva e 1 afetiva) do grupo de pianistas amadores. Comparamos diversas características acústicas das gravações e encontramos mais características relacionadas à expressividade nas performances afetivas tais como legato, fraseado, piano e agógica indicando maior grau de expressividade nas performances afetivas. Nas análises de desempenho e nos relatos dos voluntários, encontramos dados que indicam a existência de uma modulação recíproca entre cognição e emoção nas performances pianísticas. De acordo com estes resultados, os aspectos cognitivos eram inibidos nas performances afetivas, ao passo que a expressividade e o automatismo eram inibidos nas performances cognitivas. No terceiro experimento, três grupos de voluntários ouvintes analisaram o grau de expressividade de quatro performances selecionadas de dois pianistas (1 cognitiva e 1 afetiva de cada pianista). O estado emocional dos voluntários ouvintes antes e depois da audição de cada gravação foi também analisado por meio de escala analógica. As análises estatísticas demonstraram que o treinamento musical e o gênero podem interferir na percepção da expressividade interpretativa musical, e que as execuções afetivas causaram mais alterações nos estados de relaxamento e concentração que as execuções cognitivas. Na segunda parte (o quarto e o quinto experimentos) que aborda os aspectos neurofisiológicos, os experimentos foram realizados dentro da ressonância magnética funcional (fMRI do inglês *functional Magnetic Resonance Imaging*). Na tarefa do quarto experimento, os voluntários escutaram pacivamente as gravações de dois trechos da parte B do repertório (uma da performance afetiva e outra da cognitiva) executados pelos próprios pianistas. No quinto experimento, os voluntários escutaram as mesmas gravações utilizadas no quarto experimento, porém nestas tarefas eles tocavam a música juntamente com a gravação. Neste experimento, na condição cognitiva eles tocavam com foco atencional em aspectos cognitivos e na condição afetiva, eles tocavam com foco atencional no sentimento de

tristeza. Foram realizados contrastes entre as condições afetivas e cognitivas tanto nas tarefas envolvendo a escuta passiva, como nas tarefas envolvendo a execução pianística. Nestes contrastes, encontramos diferenças significativas em diversas áreas cerebrais. No contraste de escuta passiva da condição cognitiva, encontramos maiores ativações em áreas ligadas aos aspectos cognitivos e controle motor tais como giro frontal inferior, lobo parietal inferior, giro frontal médio, área pré-central e giro temporal médio, todos do hemisfério esquerdo. No contraste de escuta passiva da condição afetiva, encontramos maiores ativações em áreas ligadas à emoção (tais como amígdala, hipocampo, insula) corroborando a hipótese do contágio emocional. No contraste de execução pianística da condição cognitiva menos afetiva, encontramos maiores ativações em áreas ligadas aos aspectos cognitivos e controle motor como também em áreas límbicas. Essas ativações límbicas podem sugerir que as execuções com o foco atencional em aspectos cognitivos podem proporcionar uma emoção de valência negativa, uma vez que vários voluntários declararam ser “chato” e horrível tocar nessa condição. No contraste de execução pianística da condição afetiva, encontramos maiores ativações em áreas límbicas e paralímbicas principalmente no córtex frontal medial e cíngulo anterior. Portanto nossos dados indicam que a influência da cognição e emoção na performance pianística é muito complexa, envolvendo modulações de ativações cerebrais

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO DE ORIGEM MUSCULAR

Elmano Henrique Tôrres de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Ferreira da Rosa Sobreira

Tese de Doutorado apresentada em 14/05/2012

Introdução: Intolerância ao exercício é definida como uma reação anormal, aguda e reversível do músculo ao exercício, caracterizada por fadiga precoce, mialgia e/ou câimbras desencadeadas por um esforço físico. É um sintoma inespecífico e, apesar de ser muito frequente, um diagnóstico específico é raramente obtido, apesar de uma extensa propedêutica. Nosso objetivo foi descrever os achados clínico-laboratoriais dos pacientes com intolerância ao exercício como principal sintoma, comparando pacientes com e sem sinais de disfunção mitocondrial.

Método: 194 pacientes, 98 homens e 96 mulheres, com intolerância ao exercício, encaminhados para investigação de possível miopatia, foram avaliados prospectivamente. Após extensa propedêutica laboratorial e exclusão de causas sistêmicas para suas queixas, foram divididos em dois grupos, com e sem sinais de disfunção mitocondrial (lactato sérico pós esforço com elevação acima de 4,0mmol/l e/ou biópsia muscular com RRF ou fibras COX negativas). Características clínicas, histoenzimológicas, bioquímicas e moleculares foram analisadas.

Resultados: 114 pacientes (58,8%) apresentaram sinais de disfunção mitocondrial, 48 homens e 66 mulheres (grupo I) e 80 pacientes não apresentaram sinais de disfunção mitocondrial (50 homens e 30 mulheres-grupo II). A média da idade de início foi 31,3 anos (grupo I) e 28,7 anos (grupo II). 38 pacientes apresentaram padrão de herança mendeliano, AD- 12 pacientes (grupo I) e sete pacientes (grupo II); AR- 15 pacientes (grupo I) e quatro pacientes (grupo II). Dois pacientes apresentaram herança materna (grupo I). Houve uma elevada prevalência de migrânea, surdez e ataxia cerebelar no grupo I e de câimbras, rabdomiólise e hiperuricemia no grupo II. A dosagem de lactato sérico após esforço foi elevada em 98 pacientes do grupo I e os níveis mais altos foram registrados em 11 pacientes (acima de 10 mmol/l). Eletroneuromiografia demonstrou padrão miopático em 39 pacientes de cada grupo. No grupo I, a biópsia muscular evidenciou RRF em 33 pacientes e fibras COX negativas em 55 pacientes. A avaliação bioquímica da atividade das enzimas da cadeia respiratória foi realizada em 70 pacientes do grupo I e em 20 pacientes do grupo II e demonstrou redução da atividade das proteínas da cadeia respiratória em 26 pacientes do grupo I e em sete pacientes do grupo II. Dois pacientes apresentaram redução da quantificação da coenzima Q10. A principal alteração encontrada foi uma redução da atividade do complexo I em 21 pacientes do grupo I e em seis pacientes do grupo II. Os estudos moleculares demonstraram a presença da mutação de ponto do mtDNA 3460 G>A em duas pacientes (mãe e filha) e a presença de deleções múltiplas do mtDNA em 14 pacientes do grupo I, membros de 12 famílias.

Conclusões: Sinais laboratoriais de disfunção mitocondrial são frequentes em pacientes com intolerância ao exercício e representam papel significativo na patogênese dos sintomas. Apesar da intolerância ao exercício ser um sintoma inespecífico, achados clínicos e laboratoriais indicando doença multissistêmica são mais frequentes nos pacientes que apresentam sinais de disfunção mitocondrial, enquanto que câimbras são menos frequentes nesse grupo de pacientes.

EFEITOS MODULADORES DO LÍTIU E SUA INTERAÇÃO COM A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA MUSCARÍNICA SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS

Rafael Naime Ruggiero

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2012

Alterações na eficiência da transmissão sináptica límbico-cortical é um importante fator que contribui para a fisiopatologia dos transtornos neuropsiquiátricos. Essas alterações modificam a intensidade e a maneira como diferentes áreas encefálicas se comunicam, promovendo disfunções comportamentais sutis ou bem evidentes. Diversos estudos evidenciam o envolvimento do córtex pré-frontal na circuitaria disfuncional desses transtornos. A saber, o córtex pré-frontal é uma região intensamente envolvida em processamento cognitivo, planejamento executivo e controle do humor; e sofre forte modulação do sistema colinérgico e dopaminérgico durante seu funcionamento. Nesse contexto, vários trabalhos mostram que a eficácia do uso do lítio como estabilizador do humor na desordem bipolar, deve-se pelo menos em parte por sua ação em vias moleculares também envolvidas em plasticidade sináptica. Ademais, o lítio possui significativa ação potencializadora sobre a neurotransmissão colinérgica, como observado no modelo experimental de epilepsia induzido por lítio-pilocarpina. Contudo, ainda são desconhecidos os efeitos sinápticos da interação do lítio com o sistema colinérgico no córtex pré-frontal (CPF); particularmente, nas projeções hipocampo-corticais. Tendo em vista a relevância dessas interações e seu envolvimento em disfunções frontais, nosso projeto investigou os efeitos do lítio e de sua interação com a neurotransmissão colinérgica muscarínica na plasticidade sináptica límbico-frontal (hipocampo-córtex pré-frontal). Para isso, ratos pré-tratados com cloreto de lítio (127 mg/Kg, i.p.) ou veículo foram anestesiados com uretana, tendo temperatura controlada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e submetidos a implante de microeletrodos para estimulação em CA1 e registro de potenciais pós-sinápticos de campo (fPSPs) no CPFm. Após 30 min de registro de linha de base, a LTP ou LTD foi induzida por protocolo de estimulação elétrica em alta (HFS) ou baixa frequência (LFS) e o animal monitorado por 240 min de registros adicionais. Os animais receberam agonista muscarínico não-seletivo pilocarpina (PILO; 40 nmols; 1 μL ; em líquido céfalo-raquidiano artificial, i.c.v.) ou veículo imediatamente antes de HFS ou LFS. Os resultados mostram que a pré-ativação muscarínica por PILO facilita a LTP e a LTD na via CA1-CPFm. Além disso, o pré-tratamento com lítio afeta a facilitação gerada por PILO na plasticidade sináptica do CPFm, reduzindo a indução de LTP e aumentando os efeitos colinérgicos sobre a LTD. Entretanto, a injeção aguda de lítio não alterou nem a LTP nem a LTD, por si só. Esse papel dual ajuda a elucidar alguns dos mecanismos envolvidos com os efeitos terapêuticos do lítio nos transtornos de humor, bem como o entendimento de transtornos neuropsiquiátricos, como as comorbidades encontradas na epilepsia do lobo temporal.

NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL E CÉLULAS TRONCO

Milena Menezes de Amorim

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 21/05/2012

A neurite autoimune experimental (NAE) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso periférico (SNP) que possui características histológicas de infiltração de macrófagos e linfócitos no nervo e clínica de redução da atividade motora, para ou tetraparesia. Célulastronco são amplamente estudadas em doenças do sistema nervoso devido ao seu efeito neuroprotetor, imunomodulador e por auxiliar a remielinização. O estudo teve como objetivo principal observar a eficácia do tratamento de animais com NAE utilizando-se células mesenquimais estromais multipotentes. Foram utilizados 65 ratos Lewis com seis a nove semanas de idade, dentre os quais de cinco foram retirados os nervos isquiáticos para obtenção de células tronco. Os demais foram imunizados com injeção subcutânea de uma emulsão contendo peptídeo P2 58-81, *Mycobacterium tuberculosis* e adjuvante Completo de Freund. Os animais imunizados foram separados nos seguintes grupos: grupo controle, que passaram por nenhum procedimento cirúrgico (n=17); ratos tratados com concentração de 3×10^6 de células em 1mL (n=13); ratos tratados com concentração de 5×10^6 de células em 1mL (n=18); e ratos tratados com concentração de 6×10^6 de células em 1mL (n=12). A infusão de células foi realizada sob efeito de anestesia. Os animais imunizados foram pesados e passaram por avaliação clínica diária do dia anterior à imunização até o 30o dia pósimunização.

Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o post hoc de Dunn. Verificou-se que os déficits neurológicos foram menos intensos nos grupos tratados, e que o tratamento preventivo é mais que eficaz o tratamento terapêutico e a diferença foi estatisticamente significativa. Tentativa anterior divulgada em congresso e em trabalho completo por grupo europeu resultou negativa, embora efeitos favoráveis do uso de células tronco tenham sido observados na encefalite autoimune experimental (EAE) e outras doenças do sistema nervoso por diferentes grupos de pesquisa.

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO CANABIDIOL EM UM MODELO DE PSICOSE INDUZIDA POR S(+)-KETAMINA EM RATOS WISTAR

Jana Batista de Ross

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada em 23/05/2012

A esquizofrenia é uma desordem neuropsiquiátrica de importância significativa para as pesquisas na área da saúde, porém, apesar de ser alvo de inúmeros estudos clínicos e básicos ainda são levantadas muitas dúvidas a respeito de sua etiologia, fisiopatologia e tratamento. Nos últimos anos, hipóteses que relacionam a esquizofrenia a alterações em sistemas neurotransmissores têm sido bem relevantes. Atualmente a hipótese glutamatérgica complementa a dopaminérgica, já que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA induz sintomas do tipo psicóticos em indivíduos saudáveis e exacerba ou precipita sintomas da esquizofrenia em indivíduos portadores da doença, sugerindo que um estado hipofuncional desses receptores possa causar alterações secundárias em outros sistemas neurotransmissores e provocar tanto os sintomas positivos e negativos quanto os déficits cognitivos da doença. O canabidiol (CBD) é um composto derivado da *Cannabis sativa* que não apresenta os efeitos psicotomiméticos e os sintomas colaterais geralmente provocados pela utilização da planta e que são, em sua maioria, atribuídos ao delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). Recentemente os estudos a respeito da participação do sistema endocanabinóide em diversos estados fisiológicos e, também em transtornos psiquiátricos, apontam o uso terapêutico de canabinóides como uma estratégia promissora para o controle e prevenção de alguns sintomas ligados a transtornos psicóticos. O perfil antipsicótico do CBD já foi comprovado em modelos experimentais e até em análises clínicas, indicando que esse composto é capaz de prevenir estados psicóticos transitórios, provocados tanto pelo THC quanto pela ketamina, em modelos de psicose induzida. O objetivo deste trabalho foi incrementar as informações já existentes sobre o perfil antipsicótico proposto para o CBD, porém, em três tipos de tarefas comportamentais em roedores, que representam três classes de sintomas do tipo psicóticos que se assemelham aos sintomas da esquizofrenia: atividade locomotora, inibição pré-pulso do reflexo de sobressalto (PPI) e teste de interação social. No modelo utilizado, a S(+)-ketamina (KET) é eficaz na indução de comportamentos que representem sintomas do tipo psicóticos - provocou hiperlocomação, déficit no filtro sensorio-motor e prejuízo no comportamento social. Esses foram reduzidos quando realizado pré-tratamento com clozapina, com exceção do teste de interação social. Os efeitos do CBD são de acordo com o que é descrito na literatura, apresentando uma curva em U farmacológica característica e diferentes efeitos 5 de acordo com a dose empregada. A análise no monitor de atividades indica que o pré-tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg previne a hiperlocomação induzida por KET, contrastando com o pré-tratamento com CBD na dose de 60 mg/kg, que provoca o aumento do comportamento exploratório após a administração de KET. No PPI, o CBD na dose de 30 mg/kg previne o déficit provocado pela administração de KET, demonstrando-se eficaz para o tratamento de prejuízos cognitivos que acompanham as psicoses; e aumenta o reflexo de sobressalto quando associado a KET. Porém, no teste de interação social, não foram detectadas diferenças significativas. Portanto, com esses resultados, demonstrou-se que o CBD pode ser realmente efetivo para o tratamento de determinados sintomas dos transtornos psicóticos, assim como indicado em alguns trabalhos já desenvolvidos.

ATAXIAS HEREDITÁRIAS COM HIPOGONADISMO: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E NEUROFISIOLÓGICO

Charles Marques Lourenço

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Tese de Doutorado apresentada em 24/05/2012

A associação entre ataxia e hipogonadismo, embora rara, já é conhecido há cerca de 100 anos quando foram descritos os primeiros casos por Holmes em 1907. Posteriormente, Opitz e Neuhauser, em 1975, descreveram uma irmandade que apresentava hipogonadismo hipogonadotrófico, ataxia e distrofia retiniana. Outros casos dessa rara associação foram descritos nos anos posteriores (BARONCINI et al 1991; SALVADOR et al 1995) descreveram outros casos e Rump em 1997, revisou os 17 casos descritos até a época. Conquanto a associação entre hipogonadismo hipogonadotrófico já esteja bem definida na literatura, os casos de hipogonadismo hipergonadotrófico com ataxia são bem mais raros com poucas descrições na literatura (SKRE et al, 1976; AMOR et al, 2001; GEORGOPOULOS et al, 2004). Nesses relatos, houve associação com surdez neurosensorial e o intelecto era preservado.

O presente estudo objetivou documentar e descrever a associação entre ataxia espinocerebelar e hipogonadismo (hipogonadotrófico e hipergonadotrófico) em 19 pacientes brasileiros, estabelecendo o diagnóstico diferencial com ou

tros grupos de ataxia Os pacientes foram avaliados no ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Cada paciente foi avaliado clinicamente pelo mesmo examinador, sendo solicitados testes de função hormonal, eletroneuromiografia, cariótipo, exame oftalmológico, audiometria e neuroimagem (RNM de crânio), testes bioquímicos (com screening para erros inatos do metabolismo e realização de pesquisa para distúrbios de glicosilação) biópsia de músculo (com dosagem da coenzima Q10 e bioquímica da cadeia respiratória mitocondrial) além de pesquisa molecular para ataxia de Friedreich e ataxias espinocerebelares (SCAs) tipos 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 17 e DRPLA.

Dos 19 pacientes avaliados, 13 apresentavam ataxia e hipogonadismo hipergonadotrófico. Desses, dois eram irmãos, filhos de pais consanguíneos (primos em I grau); nos demais casos, não havia relato de consanguinidade dos genitores, com exceção de quatro irmãos com ataxia e hipogonadismo hipogonadotrófico, que possuíam critérios clínicos compatíveis com a síndrome de Boucher-Neuhauser. Quanto à idade de aparecimento do quadro de ataxia cerebelar, 17 pacientes apresentaram início dos sintomas antes dos 20 anos de idade e, em duas pacientes, havia concomitância de atraso neuropsicomotor com posterior evolução para quadro de atáxico ainda na primeira década de vida. Alteração oftalmológica foi observada em cinco pacientes (atrofia óptica em uma paciente com hipogonadismo hipergonadotrófico e distrofia coroidoretiniana em uma irmandade com 4 afetados). Em dois casos (ambos com hipogonadismo hipergonadotrófico), observou-se surdez neurosensorial. O cariótipo foi realizado em todos os pacientes, independentemente do sexo. Foram analisadas 100 metáfases com bandamento GTG, sendo todos os casos compatíveis com a normalidade. Em seis pacientes, pôde-se observar alteração nos achados da eletroneuromiografia. Os exames de neuroimagem evidenciaram, em 16 pacientes, atrofia cerebelar importante envolvendo tanto o vermis quanto os hemisférios cerebelares; 3 pacientes apresentavam leucodistrofia associada à atrofia cerebelar. A pesquisa de SCAs e da ataxia de Friedreich se revelou normal em todos os pacientes. Três pacientes apresentaram deficiência de coenzima Q10 muscular. Distúrbio congênito da glicosilação tipo Ia foi identificado em uma paciente do sexo feminino.

A associação entre ataxias espinocerebelares com hipogonadismo consiste em um grupo bastante heterogêneo. Embora existam entidades nosológicas relativamente bem definidas como a síndrome de Boucher-Neuhauser, ainda se carecem de estudos que possam esclarecer a etiopatogênese dessas doenças, o que pode acarretar também novas descobertas quanto às inter-relações entre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e disfunção cerebelar. Nosso estudo contribui para melhor caracterização desse grupo raro de enfermidades, confirmando a associação prévia entre deficiência de coenzima Q10 descrita apenas uma vez na literatura e apresentando a primeira família brasileira descrita com a síndrome de Boucher-Neuhäuser.

QUANTIFICAÇÃO DA LESÃO NEURONAL E MIELÍNICA NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA ATRAVÉS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Marina Campos Zuardi

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2012

Introdução: A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença degenerativa e progressiva que afeta neurônios motores da medula espinhal, tronco cerebral e/ou córtex motor. Sua manifestação clínica é bastante variada, sua etiologia desconhecida e a progressão, fatal. Não existe ainda um tratamento curativo para a ELA, porém alguns medicamentos e a realização de fisioterapia podem auxiliar, fornecendo ao paciente uma melhor qualidade de vida.

Objetivos: Testar a hipótese de que técnicas quantitativas de Ressonância Magnética (RM) são eficazes para detectar a lesão neuronal no encéfalo de pacientes com ELA no estágio inicial da doença e, verificar se existe correlação entre a lesão encefálica e a perda funcional do paciente. Dessa forma, pretende-se estabelecer um protocolo capaz de contribuir para o diagnóstico precoce da ELA.

Metodologia: Quinze pacientes com diagnóstico de ELA definida ou provável (12 homens e três mulheres), com idade entre 37 e 79 anos e seus respectivos controles foram submetidos a um protocolo de avaliação por RM, que incluiu um estudo estrutural volumétrico e quantitativo do dano neuronal e mielínico por razão de sequências ponderadas em T1 e FLAIR, da Transferência de Magnetização (MT), Relaxometria, Anisotropia Fracionada (FA) e Difusão (DTI), além da Espectroscopia de prótons. Alguns dos sujeitos foram submetidos também à uma avaliação física de força muscular, de funcionalidade através da Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale - Revised (ALSFRS-R), de qualidade de vida através da Amyotrophic Lateral Sclerosis Assessment Questionnaire (ALSAQ-40) e de quantificação da fadiga pela Fatigue Severity Scale (FSS). Os dados da RM dos dois grupos foram comparados através da análise de variância multi e univariada e submetidos à correção de múltiplas comparações de Bonferroni. Nas variáveis com diferença significativa entre os grupos, foi estudada a validade preditiva da medida, calculando-se a área sob a curva ROC e estabelecidos os

valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. Os dados das escalas foram comparados pelo teste de Mann-Whitney e correlacionados entre si e com as estruturas através da correlação de Spearman.

Resultados: As várias técnicas da RM, com exceção da MT, identificaram pelo menos uma estrutura com diferença significativa entre os dois grupos, totalizando 11 estruturas mais a razão dos metabólitos NAA/Cre. Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram satisfatórios variando entre 0,60 e 1,00, com destaque para o Volume do Giro Superior Frontal Direito e Giro Superior Frontal Esquerdo que apresentaram valores 1,00, 0,93 e 0,97, respectivamente. As escalas ALSFRS-R e ALSAQ-40 apresentaram diferença significativa entre os dois grupos, mas a FSS não apresentou. As escalas apresentaram correlação significativa entre si em quase todos os escores totais e domínios. Já a correlação das escalas com as estruturas foi significativa apenas para o Volume.

Conclusões: Técnicas como DTI, FA, Relaxometria e Volume se mostraram mais eficazes no diagnóstico precoce de pacientes com ELA do que as outras. A redução de volume de substância cinzenta se correlacionou positivamente com a ALSFRS-R. Por fim, propomos um protocolo para avaliação de pacientes com ELA, que inclua imagem volumétrica de alta resolução para cálculo da Volumetria e DTI.

INDUÇÃO DA NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (NAE) EM CAMUNDONGOS SJL/J ATRAVÉS DE INJEÇÃO DE PROTEÍNA P2 DA MIELINA DO NERVO PERIFÉRICO (MNP)

Vania Alice de Aguiar Mendes

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2012

A neurite auto-imune experimental (NAE) é uma polineuropatia desmielinizante monofásica do sistema nervoso periférico (SNP). A NAE é considerada modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré (SGB). Por se tratar de uma doença auto-imune, pode ser induzida experimentalmente em camundongos geneticamente suscetíveis, através da imunização com componentes da mielina de nervos periféricos. Para a indução da NAE podem ser utilizados P0 e P2, proteínas da mielina do nervo periférico, ou sequências conhecidas de peptídeos dessas proteínas 180-199 e 58-81 respectivamente, consideradas neuritogênicas, ou ainda transferência adotiva de linfócitos T CD4+, oriundas de camundongos previamente imunizados. Para o presente estudo foram utilizados camundongos fêmeas SJL/J não-grávidas, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando de 17 a 20 g. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle e outro com NAE. 200 µg de da sequência de peptídeos 58-81 de P2 emulsificada em 100 µL de adjuvante de Freund completo (AFC) foram injetados por via subcutânea, em quatro locais na região lombar. Para os controles, foi utilizado solução tamponada de fosfato (PBS), emulsionada em AFC desprovida da sequência 58-81 de peptídeos P2, injetada no mesmo local, na mesma quantidade e forma. Cada camundongo tratado com P2 recebeu 200 ng de toxina pertussis em 100 µL de PBS intraperitonealmente (i.p.) nos dias 0 e 2 pós-imunização (p.i.). No grupo controle, volumes iguais de PBS e toxina pertussis foram administrados pela mesma via sem o peptídeo. Avaliações da motricidade foram realizadas diariamente até o 60º dia, além de análises funcionais e eletroneuromiográficas. Foram encontradas alterações exclusivamente eletrofisiológicas, desmielinizantes e axonais, em cerca de dois terços dos camundongos. Sendo o camundongo SJL/J considerado o camundongo mais susceptível para a provocação de NAE, os achados do presente estudo indicam a limitação do modelo: ausência de alterações motoras detectáveis clinicamente, ocorrendo distúrbios eletrofisiológicos em apenas parte dos animais. O melhor modelo de NAE continua sendo o provocado no rato Lewis por proteína da mielina periférica bovina. É desejável que se continue buscando o modelo experimental de NAE em camundongos, tendo em vista que essa espécie animal é a mais bem estudada na Biologia animal e, por essa razão, dela haver extensíssima variedade de imunobiológicos disponíveis para estudo da patogênica e fisiopatologia de doenças auto-imunes.

VALIDAÇÃO DO TESTE DINAMOMÉTRICO DE CONTRAÇÃO VOLUNTÁRIA MÁXIMA ISOTÔNICA DURANTE 5 MINUTOS E IDENTIFICAÇÃO DE FADIGA PATOLÓGICA EM PACIENTES COM INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO FÍSICO

Flávia Oliveira Toledo

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Ferreira da Rosa Sobreira

Tese de Doutorado apresentada em 01/06/2012

A fadiga muscular é definida como a diminuição do desempenho do músculo esquelético durante o exercício físico. Em pacientes com intolerância ao exercício (IE) como queixa predominante, o sintoma de fadiga é um fator incapacitante.

A proposta do nosso estudo foi validar o teste dinamométrico de CVM isotônica durante 5 minutos para a medida objetiva da fadiga em pacientes com IE como queixa predominante. No nosso estudo realizamos: a adaptação transcultural da FSS para o português e o teste de suas propriedades psicométricas para o uso no processo de validação (validade de construto convergente) do teste de fadiga desenvolvido, validação desse teste de fadiga, determinação da faixa de normalidade do referido teste em um grupo de indivíduos normais e identificação da fadiga patológica de pacientes com IE como queixa predominante. Duzentos e três indivíduos adultos (54 pacientes com diagnóstico clínico de miopatia, 87 pacientes com IE como queixa predominante e 62 controles saudáveis) participaram desse estudo. Os pacientes estavam em seguimento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Primeiramente, foi realizada a adaptação transcultural e o teste das propriedades psicométricas da versão em português da FSS (FSS-P) em uma amostra de 55 adultos (40 indivíduos com miopatias e 10 indivíduos saudáveis). As análises realizadas foram: análise estrutural, consistência interna, confiabilidade intra-observador e validade de construto convergente com o Questionário de Fadiga de Chalder (QFC) e Escala Visual Analógica (EVA), apresentaram propriedades psicométricas satisfatórias. A análise fatorial apresentou um único fator, a consistência interna demonstrou confiabilidade satisfatória, a confiabilidade intra-observador demonstrou estabilidade das medidas da escala e a validade de construto convergente confirmou nossas hipóteses de correlações satisfatórias entre a FSS-P com o domínio físico do QFC e também, com a EVA. Participaram 99 adultos no estudo de validação do teste dinamométrico de CVM isotônica durante 5 minutos usando um dinamômetro pneumático de preensão palmar, sendo 55 pacientes com IE como queixa predominante e 44 adultos saudáveis. Nesse estudo foram realizadas: confiabilidade relativa e absoluta, validade de construto com a FSS-P e EVA, validade de critério com o teste de 45% de CVM isotônica durante 10 minutos e validade de grupo conhecido. A confiabilidade relativa foi analisada entre o mesmo examinador ($n=35$) e entre examinadores diferentes ($n=20$) em dois momentos distintos e apresentaram valores elevados de coeficientes de correlação intraclassa (CCI), indicando uma boa confiabilidade. A confiabilidade absoluta foi analisada através do erro padrão da medida e através do gráfico de Bland e Altman, indicando confiabilidade satisfatória. De acordo com nossas hipóteses, a validade convergente ($n=59$) com as escalas (FSS-P e VAS) apresentou coeficientes de correlação de baixa magnitude. A validade de critério ($n=59$) apresentou coeficientes de correlação de magnitude moderada. Na validade de grupo conhecido, o minuto 5 do teste desenvolvido apresentou diferença significativa entre os grupos com IE (com e sem disfunção mitocondrial), endocrinopatia e controles saudáveis ($p<0,01$). A faixa de normalidade do teste de fadiga obtida através dos valores de CVM em % para o grupo de 22 indivíduos saudáveis variou de 0,51 a 0,97. Trinta e dois pacientes com IE e disfunção mitocondrial, IE sem disfunção mitocondrial e miopatia mitocondrial, que não participaram do processo de validação do teste de fadiga, foram avaliados com o teste de fadiga. Dentre os indivíduos, treze pacientes foram caracterizados com valores de CVM abaixo da faixa de normalidade (menores que 0,51), indicando fadiga patológica. No nosso estudo, concluímos que o teste dinamométrico de CVM isotônica durante 5 minutos é confiável e válido e, também é capaz de detectar a fadiga patológica em indivíduos com IE como queixa predominante.

ANÁLISE COMPORTAMENTAL, FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NOCICEPTIVA DURANTE O PERÍODO NEONATAL EM RATOS WISTAR DE DIFERENTES GÊNEROS E IDADES

Nathalia Leilane Berto Machado

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Paula Sassoli Fazan

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/06/2012

O período neonatal é caracterizado por uma alta plasticidade, podendo as experiências neonatais moldar o sistema sensorial a curto e longo prazo. Objetivou-se no presente estudo analisar os aspectos comportamental, funcional e morfológico dos efeitos da estimulação nociceptiva durante o período neonatal em ratos Wistar de diferentes idades e gêneros.

Foram utilizados 96 animais, separados em 16 grupos, compostos por 6 machos e 6 fêmeas com 15, 30, 90 e 180 dias de vida; 8 grupos foram submetidos a estímulos nociceptivos imediatamente após o nascimento por 15 dias consecutivos e os demais 8 grupos receberam estímulos táteis (controles). No dia anterior ao sacrifício, os animais foram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado para posterior análise comportamental; foram também realizados os testes de pressão da pata e de estimulação tátil para avaliação da sensibilidade nociceptiva. Os animais foram então pesados, anestesiados e perfundidos. Para análise neuronal da medula espinal foi utilizada a coloração de Nissl. A contagem dos neurônios foi realizada com o auxílio do programa computacional Image J. A análise estatística dos dados consistiu na comparação dos dados obtidos entre machos e fêmeas (teste t de student não pareado para dados com distribuição normal) e entre as

diferentes idades no mesmo gênero (One way ANOVA, seguida de um pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal). Consideraram-se diferenças significativas quando $p < 0,05$. Foram detectadas alterações comportamentais em curto prazo e alterações sensitivas persistentes, sugerindo que a estimulação nociceptiva no período neonatal pode desencadear alterações em curto e longo prazo.

FREQUÊNCIA MUTACIONAL DAS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES DOS TIPOS 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 17 E ADRPL EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA DE PACIENTES COM ATAXIA ESPINOCEREBELAR DE INÍCIO TARDIO

Vívian Pedigone Cintra

Orientador: Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/06/2012

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (AEC) são um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças neurodegenerativas debilitantes relacionadas a pelo menos 36 loci genéticos diferentes e caracterizadas por ataxia cerebelar progressiva em associação com algumas ou todas das seguintes condições: oftalmoplegia, sinais piramidais, distúrbios do movimento, retinopatia pigmentar, neuropatia periférica, disfunção cognitiva e demência. A frequência relativa das diferentes AEC variam amplamente entre os diferentes grupos étnicos, provavelmente devido a um efeito fundador. Nós investigamos a frequência das mutações causadoras das AEC1, AEC2, AEC3/DMJ, AEC6, AEC7, AEC8, AEC10, AEC12, AEC17 e ADRPL em pacientes brasileiros pertencentes a 150 famílias não correlatas com padrão de herança autossômico dominante e 23 pacientes esporádicos com ataxia, originários de diferentes regiões geográficas do Brasil (estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe e especialmente São Paulo). Este estudo foi realizado entre julho de 1998 a dezembro de 2011, com base em pacientes com sinais e sintomas de AEC, atendidos pelo ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. A análise molecular dos loci com repetição dos trinucleotídeos e pentanucleotídeos foi realizada de acordo com os métodos da literatura.

Duzentos e sessenta e cinco pacientes (82,8%) pertencendo a 131 famílias não correlatas (87,3%) foram identificadas com alguma mutação AEC e apenas 19 famílias (12,7%) permaneceram não diagnosticadas; a AEC3 foi responsável pela maioria dos casos familiares (70,7%), seguida pela AEC7 (6%), AEC1 (5,3%), AEC2 (2,7%), AEC6 (1,3%), AEC8 (0,7%) e AEC10 (0,7%). Nenhum deles tinha AEC12, 17 ou ADRPL. Entre os casos esporádicos, nenhuma mutação foi detectada. A frequência da AEC3 no Brasil representa uma das maiores frequências para estas expansões já relatadas em qualquer país, provavelmente refletindo um efeito fundador português.

AMÍGDALA MEDIAL DE RATOS AO LONGO DO CICLO ESTRAL: ESPINHOS DENDRÍTICOS, ULTRAESTRUTURA SINÁPTICA, EXPRESSÃO GÊNICA E LATERALIDADE

Janaína Brusco

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira /Coorientador: Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho

Tese de Doutorado apresentada em 27/06/2012

A região pósterio-dorsal da amígdala medial (MePD) está envolvida com o comportamento sexual e possui receptores para estrógenos e andrógenos. A densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da MePD é diferente entre ratos machos e fêmeas e ao longo do ciclo estral. Espinhos dendríticos são estruturas pós-sinápticas plásticas e especializadas, cujo estudo é muito importante para o entendimento da plasticidade de uma região. Dados eletrofisiológicos mostraram que a MePD é diferente entre os hemisférios cerebrais em machos e fêmeas. O objetivo desta tese foi avaliar o dimorfismo sexual e as alterações causadas pelo ciclo estral na morfologia e expressão gênica da MePD em ratos.

Foram estudadas a ultraestrutura tridimensional (3D) de ramos dendríticos, espinhos dendríticos e contatos sinápticos; os aspectos moleculares de terminais inibitórios sobre ramos e espinhos dendríticos; e a expressão gênica de NR1, NR2B, Narp, GAD65 e GAD67 na MePD dos hemisférios direito (HD) e esquerdo (HE) de ratos e ratas ao longo do ciclo estral. Os dados morfológicos foram obtidos com microscopia confocal, microscopia eletrônica de transmissão (MET) de rotina, reconstruções 3D de cortes seriados ultrafinos para MET e imunoeletromicroscopia para GABA. Os dados para a expressão de mRNA e proteínas foram obtidos mediante qRT-PCR e *Western blotting*.

A densidade de espinhos dendríticos na MePD do HE de machos é (média \pm DP) $1,15 \pm 0,67$ espinhos/ μ m dendrítico. Esses espinhos foram classificados como finos (53%), com formato de cogumelo (22,5%), achatados e espessos (21,5%), ramificados e filopódios (3%).

Espinhas recebendo mais de um contato sináptico e espinhas com uma espínula foram reconstruídos em 3D a partir de cortes seriados ultrafinos para MET. Neste trabalho descrevemos também sinapses elétricas, protrusões axonais e botões fazendo sinapse em passantes nos axônios da MePD. A maior parte dos contatos sinápticos da MePD foram encontrados em ramos dendríticos (76%), sendo a maioria desses excitatórios (72%).

Aproximadamente 8% das sinapses sobre espinhos dendríticos foram simétricas e GABAérgicas. A MePD do HD de ratas em proestro apresentou uma proporção menor de sinapses excitatórias e maior de sinapses inibitórias do que o HE do mesmo grupo e do que o HD de fêmeas em diestro e estro. O número total de vesículas sinápticas, de vesículas revestidas com clatrina e de vesículas ancoradas/ μ m² do terminal pré-sináptico foi maior na MePD do HD do que no HE de fêmeas em diestro, proestro e estro. Vesículas pequenas de centro elétron-denso (VPCD) foram mais frequentes na MePD do HE do que no HD de fêmeas em diestro, proestro e estro. O HD de machos mostrou mais terminais contendo VPCD do que o HD de fêmeas em diestro e estro; e o HE de machos menos terminais com VPCD do que o HE de fêmeas em proestro e estro. A análise dos dados de qRT-PCR mostrou que transcritos para NR1 são mais expressos em fêmeas em estro do que em machos ou fêmeas em proestro, mas não foi encontrada diferença na expressão de NR2B. A expressão do mRNA para Narp foi maior em fêmeas em estro do que em fêmeas em diestro. Machos apresentaram maior quantidade de mRNA para GAD65 do que fêmeas, e fêmeas em estro maior expressão de GAD65 do que fêmeas em diestro e proestro. A expressão do mRNA para GAD67 foi maior em machos do que em fêmeas em diestro ou proestro, e fêmeas em estro tiveram níveis maiores do que machos e fêmeas em outras fases do ciclo estral. No estudo da expressão proteica não foram encontradas as mesmas diferenças vistas para a expressão do mRNA. Fêmeas em estro demonstraram maior expressão proteica de GAD65 do que fêmeas em diestro na MePD do HE.

A caracterização morfológica dos espinhos dendríticos da MePD sugere alta plasticidade na região, já que 56% desses são finos, ramificados ou filopódios. Existem relatos de sinapses inibitórias sobre espinhos dendríticos e de espinhos multisinápticos em outras regiões cerebrais, mas esta é a primeira vez que este tipo de contato é relatado na MePD do rato adulto. A MePD do HD de fêmeas, em todas as fases do ciclo estral estudadas, teriam maior atividade sináptica do que a MePD do HE desses mesmos animais e do que machos, sendo que monoaminas estariam presentes em mais terminais do HE em fêmeas.

Esses dados pressupõem compartimentalização de vias e função entre as MePDs de ambos os hemisférios cerebrais de fêmeas. Além disso, dados aqui apresentados indicam que a expressão gênica de elementos sinápticos excitatórios e inibitórios da MePD é alterada pela flutuação dos hormônios gonadais e é diferente entre os hemisférios cerebrais. Este trabalho mostra dados morfológicos e moleculares inéditos para a MePD sobre a influência dos hormônios gonadais

APLICAÇÃO DO TESTE DAS TRILHAS COLORIDAS EM IDOSOS BRASILEIROS COM BAIXA ESCOLARIDADE

Fernanda Belinassi Balarini

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Speciali

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/06/2012

O Teste das Trilhas Coloridas (TTC) é uma versão do Trail Making Test (TMT) que buscou minimizar a influência da escolaridade e fatores sócio-culturais sobre a avaliação da atenção e seus vários componentes, substituindo as letras do alfabeto por cores. Sabe-se que o processo de envelhecimento natural, assim como quadros patológicos, como as demências, podem acarretar perdas cognitivas que envolvem o funcionamento atencional. Nesse sentido, diante da necessidade de instrumentos de avaliação neuropsicológica para idosos no Brasil, que considerem os baixos níveis educacionais apresentados por essa população, o presente estudo teve como objetivo analisar as qualidades psicométricas do TTC em idosos brasileiros com baixa escolaridade. Participaram dessa investigação 126 idosos, sendo 53 do grupo de Idosos Saudáveis (IS), 46 do grupo de Demência por doença de Alzheimer (DDA) e 27 do grupo de Demência com comprometimento cerebrovascular (DCV). O delineamento metodológico incluiu três procedimentos de análise das propriedades psicométricas do TTC. No primeiro, foi avaliada a fidedignidade de seus escores em 30 participantes do grupo IS (IS-Fid), utilizando-se o método de Teste-Retest, com intervalo de um mês entre as duas aplicações. No segundo, analisou-se a validade por construto relacionado do TTC em uma sub-amostra de 28 participantes do grupo IS (IS-Vali), cujos resultados desse instrumento foram correlacionados com os resultados do Teste de Atenção Concentrada (AC). Por

fim, no terceiro procedimento, após emparelhamento dos participantes dos grupos, de acordo com idade e escolaridade, foi avaliada a validade de critério concorrente do TTC, comparando-se o desempenho de cada um dos grupos (IS-ValiC, DDA e DCV) nesse instrumento. Foram verificadas, também, sua sensibilidade e sua especificidade. Os resultados demonstraram altos índices de estabilidade temporal para as medidas do TTC entre as duas aplicações do Teste-Retest (intervalo de um mês) para a sub-amostra analisada. Em relação à validade por construto relacionado, o TTC apresentou coeficientes de correlação significativos com o AC, instrumento que também avalia aspectos da atenção. No que se refere à validade de critério, o TTC demonstrou boa capacidade na discriminação entre os três grupos analisados (IS-ValiC, DDA e DCV), sendo que o grupo IS-ValiC obteve desempenho significativamente superior ao dos grupos clínicos (DDA e DCV) e o grupo DCV apresentou o pior desempenho dentre os três grupos. Verificou-se que o TTC indicou boa acurácia diagnóstica na diferenciação entre indivíduos com e sem demência, com altos níveis de sensibilidade e especificidade. Conclui-se que o TTC revelou-se um instrumento fidedigno e válido para aplicação em idosos brasileiros com baixa escolaridade e, por ter-se demonstrado um instrumento sensível às perdas atencionais dos grupos clínicos avaliados (DDA e DCV), pode ser utilizado como ferramenta auxiliar na investigação dessas patologias.

Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

SAÚDE OCULAR NA POPULAÇÃO INDÍGENA KADIWÉU DO MATO GROSSO DO SUL

Tânia Gisela Biberg-Salum

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/04/2012

Objetivo: O perfil epidemiológico dos povos indígenas no Brasil ainda não é suficientemente conhecido, principalmente no que se refere aos aspectos oftalmológicos das etnias residentes na região Centro-Oeste. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi conhecer as condições de saúde ocular da população indígena Kadiwéu, que habita as aldeias da serra Bodoquena, no Mato Grosso do Sul.

Método: Foi conduzida uma pesquisa observacional, transversal e descritiva, desenvolvida na Aldeia Alves de Barros, na Serra da Bodoquena, no município de Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul. Foram sujeitos da pesquisa 193 índios de um total estimado de 1.197.

Resultados: Da amostra avaliada, 74,9% apresentaram acuidade visual maior ou igual a 0,8. Dentre as ametropias, a hipermetropia foi o achado mais comum (9,3%) e a miopia o menos comum (2%). Dentre os achados da conjuntiva, a melanose e o pterígio foram os mais frequentes, com porcentagens de 25,4 e 14,7, respectivamente; em relação à avaliação das pálpebras, o achado mais comum foi a dermatocalase, com frequência de 4,5%. Quanto à córnea, encontraram-se casos de leucoma (n=4) relacionados a trauma ocular e uma suspeita de ceratocone; opacificação de cristalino foi observada em 5,6% dos indígenas avaliados e um caso de coloboma de íris foi verificado. Apenas um dos avaliados apresentou estrabismo convergente e um estrabismo divergente e não foram observados casos de hipertensão ocular ou glaucoma. Nenhum caso de discromatopsia foi encontrado.

Conclusão: Pode-se concluir que os indígenas desta etnia apresentam, na sua maioria, boas condições oculares, com acuidade visual $\geq 0,8$, tendo apresentado, como alterações mais comuns, melanose da conjuntiva, pterígio, opacificação do cristalino, dermatocalase e sequelas de traumatismos. A hipermetropia foi a ametropia mais comum (9,3%) e a miopia a menos comum (2%).

TERAPIAS ADJUVANTES À TRABECULECTOMIA: METANÁLISE DE ENSAIOS CLÍNICOS ALEATORIZADOS

Lígia Issa De Fendi

Orientador: Prof. Dr. Jayter Silva de Paula

Tese de Doutorado apresentada em 18/04/2012

Proposta: Realizar uma revisão sistemática com metanálise de ensaios clínicos aleatorizados (ECAs) que avaliaram os diferentes tratamentos adjuvantes à trabeculectomia (TREC).

Objetivo: Comparar a eficácia e segurança do uso dos diversos tipos de tratamentos adjuvantes à TREC. Métodos: Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados eletrônicas do MEDLINE, EMBASE, Cochrane Eyes and Vision Group Trials Register na biblioteca Cochrane, <http://www.controlled-trials.com> e LILACS em busca de ECA que comparassem pacientes submetidos à TREC sem tratamento adjuvante versus mitomicina C (MMC), 5-fluoracil (5FU), betaterapia (BRT), ácido hialurônico (AH), ciclosporina ou corticoide, além daqueles envolvendo MMC versus 5FU, ou que estudassem o uso de qualquer outro agente adjuvante. Os artigos selecionados foram analisados e os dados referentes à taxa de falha cirúrgica, média final da pressão intraocular (PIO) e complicações foram coletados. As análises destes dados foram realizadas com o programa Review Manager 5.0. Quando as mesmas não foram possíveis, uma análise descritiva foi realizada.

Resultados: A MMC, o 5FU e a BRT apresentaram menor índice de falha cirúrgica na TREC em relação ao uso de placebo [Odds Ratios: 0,28 (0,20-0,39); 0,43 (0,32-0,58); 0,12 (0,05-0,27), respectivamente; $P < 0,05$]. Quando comparados diretamente, a MMC apresentou taxa de sucesso cirúrgico maior do que o 5FU [Odds Ratio: 0,44 (0,24-0,81); $P < 0,05$]. Em relação a PIO, a MMC apresentou menor média final quando comparada diretamente com o 5FU [-2,17 mmHg (-3,26 a -1,08 mmHg) $P = 0,02$]; o mesmo ocorreu com a BRT em relação ao controle [-1,87 mmHg (-2,10 a -1,65 mmHg) $P = 0,0001$]. Na análise descritiva, a ciclosporina e os corticoides apresentaram melhores resultados do que os controles, o que não foi observado com o AH. As seguintes complicações foram mais frequentes com tratamentos adjuvantes à TREC: hipotonia (MMC, 5FU); câmara anterior (CA) rasa, hipotonia, vazamento pela ampola de filtração e ceratite epitelial (5FU). Não houve diferença significativa na ocorrência de complicações com os tratamentos BRT, ciclosporina e corticoides, e foi descrita menor frequência de hipotonia, CA rasa e descolamento de coróide com o uso do AH.

Conclusão: A TREC apresenta melhores resultados quando os agentes adjuvantes descritos na literatura são utilizados, com evidência significativa para MMC, 5FU e betaterapia. O AH, ao contrário da ciclosporina e dos corticoides, não interferiu positivamente no sucesso da TREC, porém mais estudos envolvendo estes agentes são necessários. A BRT, seguida da MMC e do 5FU, apresentou maiores índices de redução absoluta do risco de falha, sendo que em comparação direta, a MMC se mostrou melhor do que o 5FU em termos de sucesso qualificado.

AMPLITUDE DE PULSO OCULAR EM PACIENTES COM HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

Hissa Tavares de Lima Gradvohl

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/04/2012

Objetivo: Avaliar a amplitude de pulso ocular (APO) em pacientes com hipertensão arterial sistêmica, comparando com o grupo controle, e eventuais influências da espessura central da córnea e do comprimento axial (COMPRaxial) do olho na APO.

Método: Foram examinados 152 olhos de 76 pacientes com hipertensão arterial sistêmica e 136 olhos de 68 indivíduos que compuseram o grupo controle. Todas as medidas foram tomadas pelo mesmo examinador, no período das 7 às 10h da manhã, na seguinte ordem: pressão arterial sistêmica, tonometria de contorno dinâmico, COMPRaxial e paquimetria (PAQ). A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t para médias de dados pareados e, para as correlações, os coeficientes de Pearson ou o de Spearman. Considerou-se o nível de significância de 5%.

Resultados: A APO média dos olhos direitos dos pacientes com hipertensão arterial sistêmica foi 2,10 ($\pm 0,9$ mmHg) e a dos olhos esquerdos foi 2,03 ($\pm 0,828$ mmHg). A PAQ média dos olhos direitos foi 532,2 m (± 39 m), e a dos olhos esquerdos 532,1 m ($\pm 36,5$ m), não influenciando a APO. A variável COMPRaxial para o olho direito (OD) apresentou média de 23,44 mm ($\pm 1,477$ mm) e para o olho esquerdo (OE) foi de 23,343 em média ($\pm 1,32$ mm). Houve significância estatística quando estudada a influência do COMPRaxial sobre a APO, demonstrando correlação inversamente proporcional. A média da APO dos controles foi de 2,10 ($\pm 0,9$ mmHg) e para o OD e OE média de 2,03 ($\pm 0,828$ mmHg). Quando comparados os valores médios da APO dos casos e controles, a diferença foi estatisticamente significativa, sendo os valores dos controles maiores do que os encontrados nos pacientes com hipertensão arterial sistêmica ($p < 0,001$). Constatou-se que existe diferença entre caso e controle, tanto para o OD quanto para o OE.

Conclusões: O valor médio de APO foi menor nos pacientes com hipertensão arterial sistêmica do que nos controles; a APO não foi influenciada pela espessura central da córnea; e olhos com maior COMPRaxial apresentaram APO menor.

EXPRESSÃO DE RANTES, EOTAXINA-2, ICAM-1, LFA-1 E CCR-3 EM PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA COM POLIPOSE NASOSSINUSAL E SUA CORRELAÇÃO COM EOSINOFILIA TECIDUAL E RECIDIVA

Fransérgio Emílio Mantovani Cavallari

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima

Tese de Doutorado apresentada em 02/05/2012

A polipose nasossinusal (PNS) é uma doença inflamatória da mucosa nasal, frequentemente relacionada à eosinofilia, cujo mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Atualmente, uma série de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e seus receptores tem seu papel estudado na doença.

Objetivos: Comparar a expressão gênica das quimiocinas RANTES, da eotaxina-2, do seu receptor CCR-3, da molécula de adesão ICAM-1 e do seu receptor LFA-1 entre pólipos nasais (PNs) (n=35) e mucosa nasal controle (n=15); avaliar a correlação entre a expressão dos mediadores e a quantidade de eosinófilos no tecido e também a relação entre a eosinofilia e a recidiva da PNS.

Metodologia: A expressão gênica dos mediadores foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real em PNs e mucosas de concha média de pacientes sem doenças nasais ou alteração endoscópica; e as amostras foram analisadas histologicamente com microscopia óptica. A recidiva foi avaliada por meio de questionário preenchido em retornos ambulatoriais no pós-operatório.

Resultados: Pólipos eosinofílicos apresentam maior expressão de eotaxina-2 e RANTES, mas não de CCR-3, ICAM-1 e LFA-1, quando comparados às mucosas nasais controles; não houve correlação direta entre a expressão dos genes acima e o grau de eosinofilia tecidual; a eosinofilia relaciona-se positivamente com a recidiva da PNS.

Conclusões: O presente estudo comprova a estreita relação entre pólipos eosinofílicos e a expressão de quimiocinas de padrão inflamatório Th2, confirmando a reverberação do processo inflamatório nesse sentido; induzindo, com isso, franca e contínua eosinofilia no tecido, mesmo sem estar diretamente ligada à quantidade de eosinófilos. A eosinofilia tecidual confirma-se como fator fortemente relacionado à agressividade da PNS. A possível instituição de medicamentos que inibissem a expressão dessas quimiocinas poderia auxiliar na diminuição do processo inflamatório presente na rinossinusite crônica (RSC) com PN.

ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS TIPOS DE INCISÃO NA DACRIOCISTORRINOSTOMIA EXTERNA: TRANSPALPEBRAL E NASOJUGAL

Juliano Borges Mano

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Mitiko Santello Akaishi

Dissertação de Mestrado apresentada em 30/05/2012

O objetivo deste estudo foi comparar o aspecto estético de dois tipos de incisão (transpalpebral e nasojugal) na dacriocistorrinostomia externa, avaliar a taxa de sucesso anatômico e relatar possíveis complicações em cada tipo de incisão. Foram estudados 46 sujeitos (14 homens e 32 mulheres) submetidos à cirurgia de dacriocistorrinostomia externa. O grupo 1 (G1) foi formado por 25 pacientes operados com incisão transpalpebral. Houve um caso de cirurgia bilateral, totalizando 26 cirurgias nesse grupo. No grupo 2 (G2), a incisão nasojugal foi empregada unilateralmente em 21 pacientes. A documentação das cicatrizes resultantes foi realizada por meio de fotografias digitais padronizadas do terço médio da face dos pacientes em posição oblíqua de 30° com 30 (T1), 90 (T2) e 180 (T3) dias de pós-operatório. As fotografias foram mostradas aleatoriamente a três observadores médicos não oculoplásticos (1 oftalmologista, 1 cirurgião de cabeça e pescoço e 1 cirurgião plástico) em monitor de LCD, 22 polegadas com resolução de 1680 x 1050 pixels. Os observadores foram instruídos a quantificar a aparência da cicatriz segundo uma escala ordinal de quatro níveis. Além disso, os próprios pacientes avaliaram a cicatriz por meio de três questionários: satisfação com o aspecto estético, aparência da incisão e recomendação da cirurgia a outro paciente. Para a análise da avaliação fotográfica nos diferentes tempos cirúrgicos nas duas técnicas foi utilizada a análise de variância multifatorial (ANOVA). O teste de Tukey foi empregado para determinação das significâncias entre as variáveis estudadas. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as técnicas em relação à visibilidade da cicatriz nos tempos analisados. Apenas em relação ao fator tempo houve diferença, ou seja, a cicatriz foi mais visível em T1 do que em T2 e T3. A taxa de sucesso anatômico da cirurgia foi de 92,3% para o G1 e 90,4% para o G2. As complicações relacionadas ao G1 foram: ectrópio leve de ponto lacrimal (3 casos) e paresia transitória do músculo orbicular (1 caso). No G2 ocorreu cicatriz hipertrófica (1 caso) e epicanto (1 caso). As duas técnicas estudadas são igualmente eficazes e apresentam visibilidade mínima a partir do 30º dia de pós-operatório. As complicações foram associadas às incisões e podem ser minimizadas com medidas preventivas.

Ortopedia, Traumatologia E Reabillitação

INFLUÊNCIA DO ORIFÍCIO PILOTO NOS PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS DA INTERFACE IMPLANTE-OSSE

Patricia Silva

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino

Tese de Doutorado apresentada em 08/05/2012

Objetivo: Estudo experimental "*in vivo*" destinado avaliar a influência do diâmetro de perfuração do orifício piloto (igual ou menor que o diâmetro interno do implante) na interface osso-implante na fase aguda e oito semanas após a inserção do parafuso pedicular na coluna lombar por meio de análise histomorfométricas.

Métodos: Dez carneiros deslanados da raça Santa Inês foram operados e os parafusos pediculares inseridos bilateralmente no pedículo de L1 e L3. O orifício piloto foi perfurado por meio de broca e sonda com diâmetro menor (2,0mm) que o diâmetro interno do parafuso no lado esquerdo do pedículo e igual (2,8mm) ao diâmetro interno do parafuso no lado direito do pedículo. Os animais foram sacrificados imediatamente ou oito semanas após a inserção do parafuso pedicular. As amostras foram incluídas em metacrilato de metila, seções foram obtidas e coradas com vermelho de Alizarina e Azul Stevenel para avaliação histomorfométrica em microscopia de luz. Os parâmetros histomorfométricos do estudo incluíram: contato osso-implante, área óssea no interior da rosca do parafuso e área óssea fora do passo de rosca.

Resultados: A percentagem de contato osso-implante com a perfuração por meio de broca e sonda foi de $40,81 \pm 12,87$ e $23,20 \pm 11,63$ imediatamente após a inserção do parafuso e $62,49 \pm 19,73$ e $51,35 \pm 7,76$ oito semanas após a inserção do orifício piloto menor que o diâmetro interno do parafuso; valores de $6,15 \pm 2,69$ e $16,05 \pm 8,40$ imediatamente após a inserção e $16,38 \pm 9,42$ e $71,55 \pm 14,51$ oito semanas após a inserção do orifício piloto igual ao diâmetro interno do parafuso, respectivamente. A área de osso no interior da rosca era $37,40 \pm 5,68 \mu\text{m}^2$ e $42,77 \pm 6,58 \mu\text{m}^2$ imediatamente após a inserção e $58,47 \pm 4,68 \mu\text{m}^2$ e $50,86 \pm 11,29 \mu\text{m}^2$ oito semanas após a inserção do orifício piloto menor que o diâmetro interno do parafuso; valores de $14,22 \pm 3,85 \mu\text{m}^2$ e $32,72 \pm 8,21 \mu\text{m}^2$ imediatamente após a inserção e $41,33 \pm 9,84 \mu\text{m}^2$ e $53,82 \pm 8,26 \mu\text{m}^2$ oito semanas após a inserção de orifícios piloto igual ao diâmetro interno do parafuso. A área de osso fora da rosca era de $33,67 \pm 7,59 \mu\text{m}^2$ e $43,28 \pm 16,19 \mu\text{m}^2$ imediatamente após a inserção e $61,67 \pm 9,85 \mu\text{m}^2$ e $62,11 \pm 7,02 \mu\text{m}^2$ oito semanas após a inserção do orifício piloto menor que o diâmetro interno do parafuso; valores de $23,51 \pm 5,97 \mu\text{m}^2$ e $35,32 \pm 7,41 \mu\text{m}^2$ imediatamente após a inserção de $45,15 \pm 6,52 \mu\text{m}^2$ e $62,27 \pm 15,30 \mu\text{m}^2$ oito semanas após a inserção de orifícios piloto igual ao diâmetro interno do parafuso. Os parâmetros histomorfométricos foram significativamente maiores para o orifício piloto menor que o diâmetro interno do parafuso.

Conclusão: A perfuração por meio de broca do orifício piloto com diâmetro menor que o diâmetro interno do parafuso melhorou o contato da interface osso-implante imediatamente e oito semanas após a inserção do parafuso pedicular.

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE UMA INFORMAÇÃO SENSORIAL ADICIONAL NO DESEMPENHO MOTOR DE INDIVÍDUOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO DURANTE A ULTRAPASSAGEM DE OBSTÁCULO

Kátia Solidéia Pegoretti

Orientadora: Profª Drª Débora Bevilaqua Grossi

Dissertação de Mestrado apresentada em 18/05/2012

Ultrapassar obstáculos é uma tarefa frequentemente relacionada a quedas em indivíduos com osteoartrite (OA) de joelho. Uma informação sensorial tátil externa pode melhorar o controle postural estático, porém, não é descrito se tal informação melhora o controle do movimento dinâmico. Este estudo avaliou a influência de uma informação sensorial adicional no desempenho motor e na dor referida por indivíduos com OA de joelho durante a ultrapassagem de um obstáculo. Participaram do estudo 24 indivíduos com OA de joelho. Foi utilizada uma plataforma de força que registrava a força de reação do solo (FRS) durante a ultrapassagem. Da FRS normalizada foram analisadas as componentes verticais e ântero-posteriores, para a perna de apoio e de abordagem, nas condições com e sem a informação sensorial. A dor foi avaliada por escala visual analógica. O modelo linear de efeitos mistos foi utilizado para análise estatística das comparações entre as condições sensoriais, considerando significativo $p < 0,05$. Na presença da informação sensorial houve diminuição da duração da propulsão ($p=0,025$), tempo ao pico ativo ($p=0,041$), tempo ao pico de propulsão ($p=0,042$), pico passivo ($p=0,041$) e impulso ativo ($p=0,043$), na perna de apoio; e aumento do pico de frenagem ($p=0,033$) na perna de abordagem. Os parâmetros de dor não foram alterados. Tais resultados sugerem que a informação sensorial adicional

permitiu a realização de um movimento mais rápido, diminuição da sobrecarga sobre o aparelho locomotor na fase de resposta à carga e melhor estimativa da força aplicada contra o solo na fase de propulsão, contribuindo para melhora do controle do movimento dinâmico.

INFORMAÇÃO SENSORIAL ADICIONAL NO CONTROLE POSTURAL DE INDIVÍDUOS COM OSTEOARTRITE DE JOELHO

Catia de Lourdes Massullo

Orientadora: Prof^a Dr^a Débora Bevilaqua Grossi

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/05/2012

A Osteoartrite (OA), doença progressiva e degenerativa, é a doença articular mais comum no mundo e que mais acomete a população idosa. A dor é o principal sintoma clínico, porém a sua origem não é estabelecida. Todas as alterações articulares da OA podem levar a um comprometimento da integridade dos mecanorreceptores, os quais são responsáveis pelo senso de posição articular, já que são sensíveis ao toque e movimento. Sendo assim, é esperado que o indivíduo com OA apresente déficit proprioceptivo na articulação acometida. A propriocepção é também fator integrante do controle postural. Por tanto, indivíduos com OA que apresentam déficits proprioceptivos devem apresentar alterações no controle postural estático. Informações sensoriais adicionais, como a fixação de uma bandagem à pele, podem levar à melhora da informação proprioceptiva da articulação em indivíduos que apresentem algum acometimento de mecanorreceptores, já que estes são sensíveis ao toque, e também à uma provável diminuição da oscilação corporal. O objetivo deste estudo foi avaliar o controle postural estático e a influência da informação sensorial adicional em indivíduos com OA de joelho. Para isso foi usada uma plataforma de força para a análise da trajetória do centro de pressão (COP) em apoio monopodal e bipodal, com e sem a fixação de uma bandagem infrapatelar. Durante o apoio bipodal, ainda, foi avaliado o controle postural com ausência de informação visual. A dor foi avaliada através da aplicação de uma Escala Visual Analógica de 100mm antes e depois dos testes. As variáveis foram analisadas e foram aplicadas ANOVAs e análises lineares de efeitos mistos ($p < 0,05$) para o estudo estatístico. Os dados revelaram que o controle postural não apresenta nenhuma diferença quando comparadas as condições com e sem informação sensorial adicional. A dor também não sofreu influência da bandagem infrapatelar e da atividade proposta. A bandagem infrapatelar usada como informação sensorial adicional não foi capaz de influenciar o controle postural estático de indivíduos com OA de joelho que realizam apoio monopodal.

ESTUDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO COSTÂMERO EM SECÇÕES LONGITUDINAIS DE MÚSCULO SÓLEO DE RATAS IMOBILIZADAS E REABILITADAS PELO ALONGAMENTO PASSIVO MANUAL INTERMITENTE

Letícia Cação Beneditini de Oliveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia Mattiello-Sverzut

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2012

No tecido muscular esquelético, a interface entre o sarcolema e a matriz extracelular é constituída por proteínas especializadas responsáveis pela transmissão de força transversal e longitudinal à miofibrila. As adaptações do músculo esquelético às forças fisiológicas e patológicas, como a imobilização segmentar e exercícios de reabilitação, podem contribuir para a percepção celular dos sinais mecânicos e, consequentemente, induzir modificações na flexibilidade e na força muscular. Este estudo investigou as respostas teciduais do músculo sóleo de ratas submetido ao estresse longitudinal induzido pela associação do treinamento do tipo alongamento passivo com a livre movimentação pós-imobilização dos membros posteriores direitos. O membro posterior direito das ratas foi imobilizado por 10 dias em flexão plantar, a fim de manter o músculo sóleo em posição de encurtamento. Após a imobilização, os animais passaram por um período de alongamento passivo manual intermitente. Antes da imobilização e durante o período de alongamento e de livre movimentação, foi realizada análise funcional da marcha dos animais. Noventa e seis ratas Wistar adultas foram divididas em 8 grupos: Imobilizado (I); Imobilizado e alongado por 1 dia ($IAL_{(1)}$); Imobilizado e alongado por 3 dias ($IAL_{(3)}$); Imobilizado e alongado por 10 dias ($IAL_{(10)}$); Imobilizado e livre por 1 dia ($IL_{(1)}$); Imobilizado e livre por 3 dias ($IL_{(3)}$); Imobilizado e livre por 10 dias ($IL_{(10)}$); Controle do Imobilizado ($C_{(Imob)}$). Após os procedimentos experimentais, o músculo sóleo foi removido e congelado, para o processamento de reação de coloração Hematoxilina-Eosina; imunoistoquímica para fibronectina, colágenos tipos I e III; imunofluorescência de laminina, distrofina e macrófagos; western blot de laminina e distrofina. Análises qualitativa e quantitativa em Microscópio de Luz e sistema de análise de imagens foram realizadas. As variáveis

foram avaliadas inter- e intra-grupos pelo Modelo de Regressão Linear com Efeitos Mistos. Após a imobilização, os animais apresentaram perda de peso corporal e alterações no tamanho e formato das fibras. Ainda, a hipocinesia modificou as variáveis funcionais da marcha, reduziu a amplitude de movimento (ADM) de dorsiflexão, aumentou a relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras (rFFI/NTF), a expressão de distrofina, de laminina e dos colágenos tipos I e III. Após três dias de remobilização, as alterações morfológicas estavam exacerbadas: intensa celularidade, núcleos centralizados, corpos de inclusão, necrose. Estes achados foram mais intensos no IAL₍₃₎. Os grupos IAL₍₃₎ e IL₍₃₎ também apresentaram comprometimento funcional, restrição de ADM, aumento da rFFI/NTF e da expressão do colágeno tipo III. Outros achados observados nestes grupos foram aumento da quantidade de macrófagos no tecido e de distrofina. As anormalidades relativas aos parâmetros da marcha e as alterações morfológicas geradas pela imobilização mostraram melhora no grupo IAL(10). A remobilização associada ao alongamento durante dez dias mostrou significativa efetividade na reversão das anormalidades musculoesqueléticas induzidas pelo desuso, especialmente nas variáveis funcionais.

ESTRATÉGIAS DAS RESPOSTAS NEUROMUSCULARES EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTRAÇÃO APÓS ALTERAÇÃO DA TEMPERATURA LOCAL

Larissa Martins Garcia

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/06/2012

Aplicação de crioterapia e diatermia por ondas curtas (DOC) pode promover alterações no controle neuromuscular. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o padrão de recrutamento e a coativação dos músculos bíceps braquial (BB) e tríceps braquial (TB) em diferentes níveis de contração, bem como a força de flexão do antebraço antes e após a aplicação da crioterapia e DOC. Foram avaliadas 60 voluntárias saudáveis, sem história de doenças osteomioarticulares nos membros superiores e sem contraindicação ao uso de ondas curtas e/ou crioterapia. O sinal eletromiográfico (*root mean square* - RMS e a frequência mediana - FM) dos músculos BB e TB foi coletado pelo sistema de aquisição de dados EMG-1000 (Lynx®), e a força de flexão do antebraço mensurada com uma célula de carga (MM-50Kratos) durante contrações isométricas de flexão do antebraço a 25%, 50%, 75% e 100% da contração isométrica voluntária máxima (CIVM). As voluntárias foram distribuídas igualmente em três grupos: crioterapia (GCR), diatermia por ondas curtas (GOC) e controle (GC). A aplicação de crioterapia teve duração de 30 minutos, a de DOC duração de 20 minutos e o GC permaneceu em repouso por 30 minutos, sendo que as aplicações dos recursos físicos ocorreram sobre os músculos BB e TB. A coleta dos dados foi realizada antes e após aplicação ou não do recurso. Para a comparação das variáveis estudadas, foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) sendo fixado em todos os cálculos um nível crítico de 5% ($p > 0,05$). Os resultados mostraram que não houve alteração em relação à força de flexão do antebraço em nenhum dos três grupos antes e após a aplicação dos recursos. Após aplicação de DOC, em relação ao músculo BB, houve redução do RMS somente no nível 100% da CIVM e na FM não houve alterações. Nenhuma diferença foi encontrada no RMS nem FM no GOC em comparação ao GC. A aplicação de crioterapia promoveu aumento do RMS e diminuição da FM do músculo BB em todos os níveis de contração. Além disso, foram encontrados em todos os níveis de contração valores maiores de RMS e menores de FM do músculo BB no GCR em comparação com o GC no período pós. Em relação à correlação muscular entre BB e TB, o RMS não apresentou padrão de correlação. Já a FM apresentou fraca correlação nos GC e GOC tanto no pré como no pós. Para o GCR, houve correlação moderada da FM nos níveis de contração 75 e 100% após a aplicação do recurso. Diante disso, conclui-se que a aplicação de crioterapia alterou as respostas neuromusculares enquanto a aplicação de DOC não promoveu tais alterações. No que se refere à força de flexão do antebraço, nenhum dos recursos térmicos foi capaz de alterá-la.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM CIMENTO ÓSSEO ESPONJOSO PARA PREENCHIMENTO DE FALHAS ÓSSEAS. ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ENSAIO MECÂNICO

Bruno Cimatti

Orientador: Prof. Dr. Edgard Eduard Engel

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/06/2012

Introdução: O tratamento dos tumores ósseos benignos é frequentemente realizado por abordagem intralesional com curetagem do tumor e preenchimento da falha óssea com substâncias biológicas ou sintéticas. Entre as biológicas estão os vários tipos de enxertos e o maior representante das sintéticas é o cimento ósseo ou polimetilmetacrilato (PMMA).

O uso do cimento ósseo sólido, pode apresentar problemas devido à necrose térmica, ao afrouxamento asséptico, à incapacidade de remodelação e à elasticidade inadequada em relação ao osso normal. O desenvolvimento de um cimento ósseo esponjoso que atenda a estas demandas mecânicas e biológicas e que seja de fácil manipulação no ambiente cirúrgico tem estimulado alguns autores. Basicamente, é possível formar poros no interior do cimento por mistura de substâncias hidrossolúveis ou por reação química produtora de gás. Objetivo: Desenvolvimento e caracterização física e mecânica de um cimento ósseo com poros intercomunicantes de aspecto estrutural esponjoso.

Material e métodos: A produção de cimento esponjoso foi realizada misturando-se o PMMA com bicarbonato de sódio e ácido cítrico. 90 corpos de prova com 40 mm de altura por 20 mm de diâmetro foram distribuídos em 6 grupos (n=15): G1 formado por cimento esponjoso em que antes da polimerização do cimento foram adicionados bicarbonato de sódio e ácido cítrico na proporção de 10% em relação ao componente sólido do cimento (polímero); G2 - cimento esponjoso na proporção de 20%; G3 - cimento esponjoso na proporção de 30%; G4 - cimento ósseo de PMMA compacto; G5 - formado por cimento de poliuretana de mamona (Bioósteo®) na proporção de 20%; G6 - formado de corpos de prova cilíndricos de osso esponjoso extraído com trefina de côndilos tibiais proximais de bovinos. A qualidade do cimento esponjoso foi avaliada por macroscopia, cálculo de densidade, imersão em azul de metileno, tomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura e ensaio mecânico de compressão.

Resultados: A melhor forma de produção de cimento esponjoso foi pela mistura de PMMA e componentes efervescentes. O teste da imersão em azul de metileno mostrou que os G2 e G3 apresentaram melhor intercomunicabilidade. As análises com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostraram uma ampla variação no tamanho e distribuição dos poros que medem de 50µm a 3mm. Em relação aos ensaios mecânicos não houve diferenças significativas entre os grupos de cimento esponjoso G1, G2 e G3. Estes grupos apresentaram valores pouco inferiores aos do grupo G6 de osso esponjoso bovino. O grupo G4 (PMMA sólido) apresentou valores extremamente altos quando comparados aos ossos esponjosos bovino e de cimento. O grupo G5 de cimento ósseo de mamona não atingiu os valores aceitáveis de resistência mecânica.

Conclusão: Foi possível desenvolver um cimento esponjoso a base de polimetilmetacrilato pela mistura com os aditivos efervescentes, bicarbonato de sódio e ácido cítrico, que apresenta características físicas e mecânicas desejadas como substituto ósseo esponjoso nas curetagens para tratamento de tumores ósseos benignos. O cimento de mamona esponjoso na forma testada mostrou-se inadequado para os fins pretendidos.

Patologia

PERDA DE DISTROFINA E DE β -DISTROGLICANA MEDIADA PELA CALPAÍNA ESTÁ ENVOLVIDA NA PATOGÊNESE DA CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELO ANTINEOPLÁSICO DOXORRUBICINA

Érica Carolina Campos Pulici

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Rossi

Tese de Doutorado apresentada em 02/04/2012

Este estudo teve como objetivo testar a hipótese que a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina poderia estar relacionada à redução da expressão de distrofina e suas proteínas associadas em corações de ratos como possível mecanismo estrutural implicado no desenvolvimento da cardiomiopatia e insuficiência cardíaca.

Materiais e Métodos: Ratos Wistar machos foram divididos em grupos: grupo controle, e grupos tratados com doxorubicina, nas doses acumuladas de 3,75, 7,5 e 15 mg/kg, administradas ao longo de duas semanas. Os animais foram mortos 7 e 14 dias após a última injeção de salina ou doxorubicina. Os corações foram rapidamente excisados, lavados em salina gelada, pesados e colocados em formol por 24hs e incluídos em parafina para análise histopatológica e do colágeno. Porções hemiventriculares foram congeladas para as reações de imunofluorescência com os seguintes marcadores: distrofina, β -1 integrina, β -sarcoglicana, β -distroglicana, laminina- α 2, albumina, fibronectina, miosina, faloidina e calpaína. A quantificação dessas proteínas foi realizada por *western blotting*. Experimento com dantrolene foi realizado nos grupos tratados com doxorubicina: grupos controle com e sem dantrolene (5mg/kg), grupos 3,75, 7,5 e 15 mg/kg com dantrolene e avaliados 7 e 14 dias após a última injeção de doxorubicina+dantrolene. A função cardíaca, as dimensões das cavidades ventriculares foram analisadas através da ecocardiografia. A análise estatística foi realizada através do teste Anova, com nível de significância de 5%.

Resultados e Conclusão: Este estudo ofereceu dados novos que esclarecem os eventos moleculares envolvidos na cardiomiopatia induzida por doxorubicina. O tratamento com doxorubicina causou acentuada redução/perda da distrofina

e da β -dístroglicana nos cardiomiócitos e disfunção ventricular esquerda, que podem constituir, em associação com a perda das proteínas sarcoméricas actina e miosina, a base estrutural da falência cardíaca induzida por doxorubicina. Além disso, o aumento da permeabilidade sarcolemal sugere comprometimento funcional do complexo distrofina e proteínas associadas nos cardiomiócitos tratados com doxorubicina. Ademais, outro achado importante e que se relaciona com a perda das estruturas do complexo de glicoproteínas e com o aumento da permeabilidade foi o aumento significativo da expressão de calpaína, protease cálcio-dependente, nesses cardiomiócitos. O tratamento com dantrolene notavelmente melhorou a taxa de sobrevida e preservou a perda de distrofina e a função ventricular esquerda; os níveis de calpaína nos corações dos grupos tratados com dantrolene foram similares aos controles. Esses resultados apoiam a opinião que a perda da distrofina e da β -dístroglicana e a degradação das miofibrilas em ratos tratados com doxorubicina foi mediada pela calpaína. Mais estudos ainda são necessários para elucidar este mecanismo, principalmente em relação aos inibidores específicos de calpaína, que poderão fornecer novas vias de intervenção para prevenir a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina.

EVOLUÇÃO DA ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA PRODUZIDA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI GR-1/LY-6G E INFECTADOS COM AMOSTRAS DE *Aspergillus fumigatus* QUE APRESENTARAM DISTINTOS PADRÕES DE PRODUÇÃO DE ELASTASE

Raphael Luiz de Holanda e Silva

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei

Dissertação de Mestrado apresentada em 02//04/2012

Aspergilose Pulmonar Invasiva é uma doença fúngica oportunista, causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, que acomete pacientes imunodeprimidos. Para melhor compreensão dessa micose inicialmente estabelecemos em camundongos C57BL/6 um modelo experimental de depleção de neutrófilos por inoculação intraperitoneal de anticorpos anti-GR-1/Ly-6G, confirmado por contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos. A seguir, avaliamos a evolução da infecção pulmonar experimental utilizando duas amostras de *A. fumigatus*, caracterizadas previamente em fraca (amostra 699) e forte (amostra 1753) produtoras de elastase. Nenhum dos animais imunocompetentes e infectados evoluiu para o óbito, no período de 7 dias de observação. Os animais neutropênicos, infectados por ambas as amostras, apresentaram 100% de mortalidade após 5 dias, com curvas de sobrevivência praticamente sobrepostas, sugerindo que a maior contribuição para a virulência foi a condição imunológica e não a atividade de elastase da amostra fúngica. Para análise do comprometimento pulmonar, os animais foram sacrificados nos tempos 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Durante a evolução da infecção experimental foi observada uma redução da carga fúngica nos pulmões dos animais, para ambas as amostras de *A. fumigatus*, mas não foi observada uma redução da carga fúngica, diferenciada e estatisticamente significativa entre os grupos de animais neutropênicos e imunocompetentes. O padrão celular do infiltrado inflamatório observado nos pulmões dos animais neutropênicos, infectados por qualquer uma das amostras de *A. fumigatus*, mostrou predominância de células mononucleares, em infiltrados difusos, indícios de angioinvasão e invasão brônquica com ruptura de fibras elásticas em ambas as estruturas, além de exuberância de filamentação dos conídios para ambas as amostras fúngicas, desde os tempos iniciais da infecção experimental. O processo inflamatório observado nos pulmões dos animais imunocompetentes, infectados por ambas as amostras de fungos, foi constituído nos tempos iniciais por neutrófilos e se tornou exuberante após 72 horas, com predomínio de macrófagos. Foi observada integridade de vasos sanguíneos e discreta ruptura de parede brônquica no parênquima pulmonar. Para estes animais, salienta-se a ausência de transformação dos conídios de *A. fumigatus* em hifas para a amostra 699, em todos os períodos de observação. A contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) foi significativamente maior, 72 horas pós-infecção, para os animais neutropênicos e imunocompetentes, infectados por ambas as amostras do fungo. A contagem diferencial revelou a presença de macrófagos e neutrófilos, com a primeira célula sempre em maior quantidade no LBA dos animais neutropênicos em comparação com os animais imunocompetentes, independentemente do período da infecção e da amostra fúngica infectante. Ao contrário, o número de neutrófilos foi sempre mais relevante nos animais imunocompetentes. Por microscopia eletrônica de transmissão foi observado que a interação do fungo (conídios ou hifas) com as células de defesa do LBA envolveu íntima adesão e fusão entre os componentes de superfície de ambas as células. A presença de hemoglobina no LBA foi oriunda de lesão alvéolo-capilar causada pelo crescimento e invasão provocados pelas amostras fúngicas ou por lesão determinada pela própria reação inflamatória. Concluímos que os neutrófilos são essenciais na defesa contra *A. fumigatus*, pois na ausência dessa população celular os fungos rapidamente invadem e lesam o parênquima pulmonar. No entanto, deve-se considerar que a simples presença do fungo em animais imunocompetentes induz a migração de neutrófilos para o sítio da infecção, os quais também causam dano tecidual. As amostras de *A. fumigatus* com perfis distintos de produção de elastase não

refletiram em diferenças significantes para a mortalidade ou gênese das lesões pulmonares observadas em camundongos neutropênicos, sugerindo que embora a elastase contribua para a ruptura das fibras elásticas observadas no tecido pulmonar, outros fatores de virulência, como a morfogênese, podem assumir um papel mais relevante para a patogênese da API experimental.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BAG-1 E PARP-1 EM LESÕES DO COLO UTERINO ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Marcela Kazue Hassumi Fukasawa

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia Soares

Tese de Doutorado apresentada em 04/04/2012

O câncer cervical continua sendo o terceiro tipo de malignidade mais comum entre as mulheres no mundo todo, responsável por 500.000 novos casos anualmente. Só no Brasil a estimativa é de 17.540 novos casos para o ano de 2012. Vários tipos de marcadores moleculares têm sido estudados na carcinogênese incluindo proteínas associadas a apoptose tais como BAG-1 e PARP-1. Este estudo visa demonstrar a expressão imunoistoquímica de BAG-1 e PARP-1 em pacientes com lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSILs), lesões intra-epiteliais de alto grau (HSILs) e carcinomas cervicais invasores (SCCs) e verificar uma possível associação com a infecção pelo HPV. Cinquenta amostras de LSILs, cinquenta amostras de HSILs e cinquenta amostras de SCCs foram analisadas por imunoistoquímica para expressão de BAG-1 e PARP-1. A técnica de PCR foi realizada com a finalidade de detectar e tipar o HPV. Os níveis de expressão de BAG-1 foram significativamente diferentes entre os grupos LSIL e HSIL ($p=0,014$) e entre LSIL e SCC ($p=0,014$). Em relação à expressão de PARP-1, encontramos diferenças significativas entre os grupos HSIL e SCC ($p=0,022$). O DNA do HPV foi detectado em 33,1% das LSILs, em 55,1% das HSILs e em 69,6% dos SCCs. Entre os tipos virais avaliados o HPV16 foi o mais frequente nas HSILs e SCCs. Não foi encontrada associação entre a expressão de BAG-1 e a presença do HPV. No entanto, associação significativa foi encontrada entre expressão de PARP-1 e positividade do HPV no grupo HSIL ($p=0,021$). Em conclusão nossa pesquisa sugere que a expressão de BAG-1 poderia contribuir para a diferenciação entre LSIL e HSIL/SCC enquanto que PARP-1 poderia ser útil para a diferenciação entre HSIL associado à HPV e SCC. Mais estudos são necessários para esclarecer os aspectos moleculares da relação entre expressão de PARP-1 e a infecção pelo HPV, com potenciais aplicações para o prognóstico do câncer cervical.

EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A FIBROGÊNESE HEPÁTICA MURINA

Sérgio Souza Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho.

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/04/2012

Os processos fibrogênicos, ativados por mecanismos como estresse oxidativo, podem levar a um quadro de cirrose hepática, que representa uma das principais causas de morte no ocidente. Entretanto, em alguns estudos, substâncias fenólicas, como o Ácido Gálico (AG), demonstraram inibir e até regredir esses processos. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do composto fenólico AG no processo fibrogênico hepático murino. Os mesmos foram avaliados tanto na fase de progressão da fibrose, como na cirrose hepática estabelecida pela administração crônica de tetracloreto de carbono em camundongos C57. Para isso foram realizadas análises histológicas, imuno-histoquímicas, PCR e Western-blotting, estimando-se fatores relacionados à fibrogênese e mediadores inflamatórios associados. Observou-se uma diminuição importante na percentagem de áreas coradas pelo *Sirius red*, ou seja, redução na percentagem de fibrose nos grupos tratados com AG, tanto durante a prevenção ($p<0,05$), quanto na regressão da cirrose ($p<0,05$). Esta melhora foi acompanhada de redução no número de células marcadas pela α SMA nos grupos tratados ($p<0,05$). Estes mesmos parâmetros foram confirmados através da análise genômica para colágeno, assim como pelo TIMP e pelo TGF $\alpha 1$; e proteômica para NF κ B e p38 MAPK. Os achados do presente estudo demonstraram o efeito do AG sobre a prevenção e reversão do processo fibrogênico hepático. Os principais mecanismos deste processo envolvem atividades anti-inflamatórias via TGF- $\alpha 1$ e p38 MAPK, principalmente durante a indução de fibrose; assim como restrição da capacidade anti-apoptótica do NF κ B sobre as células estreladas hepáticas (CEH) na cirrose já estabelecida.

Saúde da Criança e do Adolescente

AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DOS BIOMARCADORES *TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS* (TREM)-1 SOLÚVEL E PROCALCITONINA PARA O DIAGNÓSTICO DE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA EM CRIANÇAS NO PÓS-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Alessandra Kimie Matsuno

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula C. P. Carlotti

Tese de Doutorado apresentada em 02/05/2012

O diagnóstico de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é um grande desafio, principalmente nas crianças no pós-operatório de cirurgia cardíaca. O uso de métodos invasivos para o diagnóstico de PAV tem grande limitação técnica, principalmente na população pediátrica. Ainda não se estabeleceu se os biomarcadores de inflamação e infecção podem ser úteis na melhor acurácia deste diagnóstico. Por conta disso, foi desenvolvido este estudo para avaliar se as concentrações de procalcitonina (PCT) e de TREM-1 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*) no sangue, TREM-1 solúvel no fluido do condensado da via expiratória (CVE) do ventilador mecânico e no lavado broncoalveolar (LBA) coletado por via não broncoscópica podem ter utilidade no diagnóstico de PAV nas crianças no período pós-operatório de cirurgia cardíaca.

Método: Estudo prospectivo descritivo de coorte de pacientes pediátricos no pós-operatório de cirurgia cardíaca, em ventilação mecânica, internados na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo no período de maio 2008 a abril de 2009. Os critérios de não inclusão foram diagnóstico prévio de pneumonia hospitalar e/ou sepse hospitalar. O critério de exclusão foi óbito nas primeiras 48 horas de pós-operatório. Os pacientes incluídos no estudo foram agrupados de acordo com a presença ou não de PAV, definida com base nos critérios do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Georgia) de 2007 e nos critérios clínicos e laboratoriais da equipe médica da UTIP. Foram colhidas amostras de sangue, do trato respiratório inferior pelo LBA por via não broncoscópica e fluido do CVE do ventilador para medida das concentrações de TREM-1 e amostras de sangue para medidas das concentrações de PCT. As amostras eram colhidas diariamente do primeiro dia até o sexto dia de pós-operatório ou até a criança ser extubada. Quando havia o diagnóstico de PAV, as amostras eram colhidas desde o dia do diagnóstico até o quinto dia do diagnóstico ou até a criança ser extubada. As medidas das concentrações de TREM-1 foram feitas pela técnica de *Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* e das concentrações de PCT pela técnica de *Enzyme Linked Fluorescent Immunoassay*.

Resultados: Foram incluídos no estudo 30 pacientes sendo que 18 evoluíram com PAV. Comparando as variáveis demográficas, como sexo, peso e idade, o escore de gravidade PRISM (*Pediatric Risk of Mortality*) e a classificação da complexidade das cirurgias pelo RACHS-1 (*Risk Adjustment for Congenital Heart Surgery*), não houve diferenças entre os grupos. No geral, houve aumento das concentrações de todos os biomarcadores no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Este aumento não foi relacionado com o uso de CEC, com tempo de cirurgia e com o tempo de clampeamento aórtico. Não houve diferenças das concentrações de PCT, TREM-1 sérico e de TREM-1 solúvel em LBA nos pacientes que apresentaram PAV e naqueles que não apresentaram PAV. Observou-se diferença entre os grupos nas concentrações de TREM-1 solúvel no fluido de CVE do ventilador mecânico. No dia do diagnóstico de PAV, 13 dos 18 pacientes apresentaram concentrações detectáveis de TREM-1 solúvel em CVE, enquanto que nos pacientes sem PAV até o quarto pós-operatório, não houve nenhum paciente com este biomarcador detectável ($p=0,04$, sensibilidade= 72% e especificidade = 100%, valor preditivo positivo= 100 %, valor preditivo negativo=70%). A associação de TREM-1 solúvel em CVE aos critérios do CDC aumentou a especificidade do diagnóstico de PAV no pós-operatório de cirurgia cardíaca em comparação com os critérios do CDC isolados (41%).

Conclusão: As medidas isoladas de TREM-1 solúvel em CVE podem ser úteis no diagnóstico de PAV em pacientes pediátricos no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Outros fatores além da CEC podem estar envolvidos na resposta inflamatória influenciando as variações de PCT, TREM-1 solúvel sérico e TREM-1 solúvel em LBA.

PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À HIPÓXIA CA9, VEGF, SLC2A1 E HIF1A EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

Bruno Marcelo Rocha Freire

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/05/2012

As leucemias são doenças agressivas caracterizadas por acúmulo de células imaturas malignas na medula óssea. O pico de incidência ocorre entre os 2 e 5 anos de idade e sua taxa de cura é em torno de 75- 80 %. O risco de recaída varia consideravelmente entre os pacientes e depende de algumas anormalidades genéticas e influências de fatores de crescimento. A hipóxia intratumoral tem sido considerada como sendo o evento chave no desencadeamento da angiogênese em tumores sólidos mediados por fatores indutores de hipóxia (HIF), assim como outros genes, tais quais: anidrase carbônica 9 (CA9), *GLUT1* (*SLC2A1*) e *VEGF*. Embora o **VEGF-A** tenha sido sugerido como indicador prognóstico e ter papel na resposta ao tratamento de pacientes com LLA, experiências pediátricas tem sido limitadas a poucos estudos. Em vigência desses dados, este estudo visa ampliar conhecimento sobre genes de hipóxia em LLA. O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar o perfil de expressão gênica dos genes relacionados à hipóxia CA9, VEGF, SLC2A1 (GLUT 1) e HIF1A em amostras de medula óssea (MO) em crianças e adolescentes com LLA; e Comparar o perfil de expressão com as características biológicas. Foram utilizadas 113 amostras consecutivas de medula óssea de pacientes com LLA, já estocados, diagnosticados e tratados de acordo com os protocolos do grupo brasileiro de tratamento de leucemias na infância (GBTLI-99), no Serviço de Oncologia Pediátrica do HCFMRP-USP e do Instituto Boldrini (Unicamp). A análise da expressão gênica foi realizada através de PCR em tempo real. As variáveis clínicas analisadas serão: idade, leucometria ao diagnóstico, grupo de risco, leucometria no 7º dia, morfologia de medula óssea no D14 e D28, presença de DRM de medula óssea no D14 e D28, resposta a terapia de indução (respondedores rápidos versus lentos), presença de translocações cromossômicas e evolução clínica. A associação entre as variáveis analisadas e o nível de expressão de genes será avaliada usando o teste de Mann-Whitney. Análise estatística será efetuada usando a curva de Kaplan-Meier para as curvas de sobrevida livre de eventos (SLE). Curvas para diferentes grupos serão comparadas pelo teste de log-rank. O modelo de regressão proporcional de Cox será usado para análise multivariada de fatores prognósticos. Foi encontrado expressão gênica variada, o CA9 não foi expresso em 31% das amostras analisadas. Foi encontrada associação entre maiores valores de expressão do gene VEGF e idade ao diagnóstico entre 1 e 9 anos ($p = 0,05$) e com imunofenótipo T ($p = 0,04$), e maior expressão do gene *HIF1A* e remissão clínica completa. Valores de expressão de *HIF1A* maiores que a mediana estiveram associados a maior sobrevida livre de eventos em análise uni- e multivariada no grupo total de pacientes ($p = 0,01$ e $p = 0,05$, respectivamente) e no grupo classificado com B-derivado CALLA positivo ($p = 0,01$ e $p = 0,05$, respectivamente). Não foi encontrada associação dos demais genes com as variáveis clínicas analisadas. Nossos dados sugerem associação de hiperexpressão do gene *HIF1A* como melhor sobrevida livre de eventos.

OFERTA NUTRICIONAL E VELOCIDADE DE CRESCIMENTO NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA EM RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO

Philippe Pinheiro de Paiva

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

Dissertação de Mestrado apresentada em 29/05/2012

A restrição nutricional do recém-nascido pré-termo nos primeiros dias de vida pode trazer importantes consequências ao seu crescimento, desenvolvimento e repercussões na vida adulta. O presente trabalho é um estudo analítico, observacional, longitudinal, que busca avaliar o impacto da oferta nutricional de energia, proteínas, carboidratos e lipídios na velocidade de crescimento durante o primeiro mês de vida, em uma coorte retrospectiva composta por 387 recém-nascidos de muito baixo peso que estiveram internados na Unidade Neonatal de Cuidados Intensivos e Unidade de Cuidados Intermediários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, entre os anos de 2005 a 2009. Foi calculada a velocidade de crescimento pelo intervalo entre o 7º e 28º dias de vida e realizada revisão das práticas nutricionais realizadas na primeira semana de vida e nos dias 14, 21 e 28. Foi utilizada estatística descritiva e ajustados modelos de regressão logística para se encontrar os possíveis fatores de risco para baixa velocidade de crescimento. Os resultados encontrados foram comparados às recomendações atuais de nutrição para recém-nascidos prétermo preconizadas pela literatura. A idade gestacional variou de 23 semanas a 36 semanas e três dias e o peso de nascimento variou de 455 a 1495 gramas. Foram classificados como pequenos para a idade gestacional 40,9% dos pacientes. Os nutrientes administrados somaram as vias enteral e parenteral, com média de início da oferta enteral de 4 dias ($\pm 4,4$). A oferta de carboidrato e de lipídios foi adequada às recomendações vigentes, todavia a oferta protéica alcançou o valor aproximado de 3,0 g/kg/dia ($\pm 0,6$) apenas no vigésimo primeiro dia de vida. A oferta energética não alcançou os valores recomendados até o final

da terceira semana de vida. A média da velocidade de crescimento calculada entre o sétimo e o vigésimo oitavo dia de vida foi 15,1 g/kg/dia ($\pm 6,5$). Os pacientes com menor oferta de nutrientes apresentaram a mediana da velocidade de crescimento predominantemente inferior a 15 g/kg/dia. Foi observada a queda do escore Z no momento da alta hospitalar em relação ao peso ao nascimento. O escore SNAPPE II > 30 (OR 2,46; IC95% 1,23 - 4,92) e o início da dieta enteral após cinco dias de vida (OR 2,74; IC95% 1,49 - 5,04) apresentaram associação inversa com a velocidade de crescimento. A baixa oferta de lipídio no sétimo dia (OR 2,31; IC95% 1,12 - 4,73) e de energia no décimo quarto (OR 2,79; IC95% 1,29 - 6,02) e vigésimo primeiro dia de vida (OR 2,46; IC95% 1,03 - 5,92) apresentaram associação positiva para baixa velocidade de crescimento. As práticas alimentares estudadas apresentaram valores abaixo dos recomendados pela literatura, principalmente a oferta protéica. Apesar da média da velocidade de crescimento encontrada ser semelhante à velocidade de crescimento intrauterina, grande parte dos pacientes apresentou queda no escore Z até o momento da alta hospitalar, demonstrando um crescimento inadequado quando comparado ao intrauterino. Novas recomendações nutricionais para o período neonatal devem ser planejadas para garantir o crescimento e desenvolvimento adequado desses pacientes e para a redução de riscos futuros.

Saúde Mental

VOLUMETRIA E ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE AMÍGDALA E HIPOCAMPO E MEDIDAS COGNITIVO COMPORTAMENTAIS NO TRANSTORNO DE ANSIEDADE SOCIAL

João Paulo Machado de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak

Tese de Doutorado apresentada em 03/04/2012

Introdução e justificativa: Medo e ansiedade são aquisições evolutivas importantes, responsáveis por proteger o organismo de situações de risco à sua integridade. O funcionamento inadequado de circuitos cerebrais subjacentes a estas reações pode levar ao desenvolvimento de patologias caracterizadas por respostas não-funcionais de medo e ansiedade, dando origem aos chamados transtornos de ansiedade. O transtorno de ansiedade social (TAS) refere-se ao medo irracional e consequente evitação de situações sociais, como comer, escrever ou falar em público. O TAS é o transtorno de ansiedade mais prevalente na população e causa importante sofrimento psíquico e prejuízo sócio-ocupacional. Estudos utilizando técnicas de neuroimagem demonstraram alterações funcionais na amígdala e no hipocampo de pacientes com TAS em comparação com voluntários saudáveis. Além disso, existem dados que sugerem que o TAS está associado a julgamentos predominantemente negativos por parte do portador sobre seu desempenho em situações sociais, e que esta tendência influenciaria o modo através do qual pessoas com ansiedade social avaliam pistas sociais em seu ambiente, como as emoções faciais, por exemplo. Há evidências de que o TAS consistiria de um espectro de perturbações que iriam desde a timidez leve até comportamentos graves de evitação social. Embora os dados sobre ativação funcional sejam abundantes, pouco se sabe sobre a morfologia e a composição neuroquímica do complexo amígdala-hipocampo no TAS e sobre que relação alterações nestas medidas poderiam ter com as manifestações do transtorno.

Objetivo: Este trabalho teve o objetivo de comparar pacientes com TAS, TAS sub-clínico e controles saudáveis com relação ao volume e composição neuroquímica do complexo amígdala-hipocampo e ao desempenho no Teste de Simulação de Falar em Público (TSFP) e em uma tarefa de reconhecimento de emoções faciais.

Método: Voluntários com TAS (n = 12), TAS subclínico (n = 12) e saudáveis (n = 14) realizaram o TSFP, uma tarefa de reconhecimento de emoções faciais e um exame de ressonância magnética em repouso com sequências para medidas volumétricas e de espectroscopia de próton do complexo amígdala-hipocampo. Durante o TSFP, foram medidos o pulso e a pressão arterial e aplicadas a Escala Visual Analógica de Humor (VAMS), a Self-Statements during Public Speaking (SSPS) e a Escala de Sintomas Somáticos (ESS). Resultados: Houve diferenças entre os participantes com TAS clínico e sub-clínico e os voluntários saudáveis nos escores de ansiedade e deterioração cognitiva da VAMS, nas medidas de auto-avaliação e nos níveis de sintomas somáticos durante as diferentes fases que compõem o TSFP. Além disso, o volume bilateral da amígdala e do hipocampo estava significativamente aumentado nos pacientes com TAS em relação aos voluntários saudáveis. Não foram observadas diferenças entre os três grupos com relação aos dados de espectroscopia e reconhecimento de emoções faciais. Conclusão: O TAS está associado ao aumento de volume da amígdala e do hipocampo bilateral em relação a voluntários saudáveis cuja natureza e implicações demandam estudo mais aprofundado. Além disso, portadores de TAS e TAS sub-clínico tendem a fazer avaliações essencialmente negativas do próprio desempenho, as quais estão provavelmente associadas à gênese e à manutenção do transtorno e constituem alvos terapêuticos importantes.

CONSUMO DE ÁLCOOL NA GESTAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO COGNITIVO DOS FILHOS NA IDADE ESCOLAR

Luciana Inácia de Alcântara

Orientador: Prof. Dr. Erikson Felipe Furtado

Tese de Doutorado apresentada em 16/04/2012

O consumo de álcool durante a gestação tem sido associado a alterações no desenvolvimento físico, neurológico e comportamental da criança, sendo que muitas das consequências sobre o desenvolvimento infantil apresentam ampla variação em extensão e gravidade. Os efeitos podem variar desde uma relativa normalidade até a morte perinatal e Síndrome Fetal do Álcool (SFA). No presente estudo foi avaliado o desenvolvimento cognitivo de crianças em idade escolar em relação ao padrão de consumo de álcool materno. Foram avaliadas oitenta e seis crianças de 8 a 9 anos de idade cujas mães (N = 449) haviam sido entrevistadas em 2001 durante o terceiro trimestre de gestação sobre o padrão de consumo de álcool e outras substâncias psicoativas, em um serviço obstétrico municipal da rede pública. Para avaliação cognitiva do grupo de crianças na idade escolar foi utilizada a Escala de Maturidade Mental Columbia (EMMC). O grupo constituído pelas mães ou cuidadores respondeu a um questionário sobre as condições sociodemográficas, saúde geral, e uso materno de álcool durante a gestação e recente. Foi realizada uma anamnese sobre o desenvolvimento neuropsicomotor e condições clínicas pregressas e atuais da criança. Foi utilizado o Child Behavior Checklist (CBCL 6-18 anos) para a identificação de problemas de saúde mental na infância. Resultados mostram que, em relação à avaliação cognitiva das crianças, o RPI (resultado padrão por idade) variou de 64 a 134, com valor médio de 99,95 ($\pm 16,01$) e mediana de 103. Associação estatisticamente significativa foi observada entre os escores de RPI acima de 99,95 e maior idade materna e maior peso ao nascimento ($p = 0,01$ e $0,05$ respectivamente). Diferença significativa também foi observada em relação ao número de filhos. Crianças com famílias com três ou mais filhos apresentaram RPI médio de 106,4 versus RPI de 99,10 para aquelas com famílias com menos de três filhos ($P=0,04$). Separando a amostra por gênero, observamos escores médios menores na Escala de Maturidade Mental Columbia em meninos filhos de mães que declararam cor mulata ou negra ($p = 0,02$), que fizeram uso em dias de qualquer quantidade de álcool na gestação maior que a média ($p = 0,01$) e também naqueles em que as mães usaram três ou mais doses de álcool por ocasião durante a gestação acima da média ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas para as outras variáveis analisadas. Em relação aos problemas de comportamento quando avaliados pelo CBCL, diferenças significativas foram observadas em relação ao uso de álcool durante a gestação no 2º, 3º trimestres e uso nos três trimestres com dados do GESTA-ÁLCOOL ($p = 0,05$, $p = 0,01$ e $p = 0,02$ respectivamente) e no 1º trimestre da gestação ($p = 0,05$), uso de qualquer quantidade de álcool em dias acima da média ($p = 0,01$), uso de três ou mais doses por ocasião acima da média ($p = 0,05$) com dados do INFANTO-ÁLCOOL. Foram observadas também diferenças significativas em relação ao uso atual de tabaco ($p = 0,006$), religião ($p = 0,03$) e escores médios de RPI da Escala de Maturidade Mental Columbia ($p = 0,002$) e escores de RPI um desvio-padrão abaixo da média ($p = 0,03$). Não foram observadas diferenças de média para nenhuma das outras variáveis analisadas. O uso leve/moderado de álcool na gestação esteve associado ao menor desempenho cognitivo e problemas comportamentais totais, especialmente em meninos. Estudos controlados com um número maior de casos e a introdução de marcadores biológicos de exposição ao álcool na gestação são necessários, a fim de possibilitar uma detecção precoce dos efeitos adversos, uma melhor compreensão da gravidade e da extensão dos danos no desenvolvimento cognitivo e identificação de funções cognitivas específicas que possam ser mais afetadas pela exposição pré-natal ao álcool, propiciando uma intervenção precoce nos possíveis déficits encontrados.

TEMPERAMENTO EM CRIANÇAS: EFEITO DA PREMATURIDADE E GÊNERO

Luciana Cosentino Rocha

Orientador: Profa. Dra. Maria Beatriz Martins Linhares

Dissertação de Mestrado apresentada em 19/04/2012

O nascimento prematuro pode expor a criança a riscos nas áreas do desenvolvimento e comportamento ao longo de sua trajetória de vida. A fim de compreender o desenvolvimento humano em amostras vulneráveis, devido ao nascimento prematuro, é necessário examinar as variáveis da pessoa, tais como temperamento e gênero. O objetivo do presente estudo foi avaliar indicadores de temperamento e de comportamento em crianças nascidas pré-termo, em comparação a crianças nascidas a termo, considerando o efeito direto ou interativo das variáveis prematuridade e gênero. A amostra de crianças nascidas pré-termo foi recrutada no Serviço de Neonatologia do HCFMRP-USP e as crianças nascidas a termo em duas creches da cidade de Ribeirão Preto. Em ambos os grupos as crianças estavam na faixa de 18 a 36 meses. O Grupo pré-termo

(PT) foi constituído por 44 crianças (50% meninas), nascidas prematuras (média de idade gestacional =31 semanas) e com muito baixo peso ao nascer (média do peso ao nascimento=1.133g), que passaram por internação em Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal. O Grupo a termo (AT) foi formado por 36 crianças (47% meninas), nascidas a termo (média de idade gestacional=40 semanas), com peso médio ao nascer de 3.227g. Os grupos eram comparáveis quanto às variáveis relacionadas ao nível sócio-econômico. Os dados foram coletados em uma única sessão de entrevista com as mães, aplicando-se as versões brasileiras do Early Childhood Behavior Questionnaire (ECBQ) de Rothbart, para avaliação do temperamento, e do Child Behavior Checklist (CBCL 1 ½-5) de Achenbach, para avaliação de problemas de comportamento das crianças. Foi realizada uma análise de variância fatorial 2 X 2 (Grupo X Gênero) para testar o efeito direto/principal ou interativo das variáveis independentes (prematuridade e gênero) nas variáveis dependentes (temperamento e comportamento). Foi adotado o nível de significância estatística de $p<0,05$. Os resultados mostraram que, quanto às dimensões dos fatores do temperamento, foi verificado o efeito direto da prematuridade no temperamento. O Grupo PT apresentou significativamente maiores escores em Prazer de Alta Intensidade e Sensibilidade Perceptual e menores escores em Desconforto, Aconchego e Focalização da Atenção, em comparação ao Grupo AT. Detectou-se também efeito direto do gênero em relação às dimensões Medo e Desconforto; as meninas apresentaram maiores escores nessas dimensões do que os meninos. Verificaram-se tendências a ter um efeito interativo entre as variáveis Grupo e Gênero em duas dimensões, a saber: Ativação Motora e Focalização da Atenção; as meninas PT tiveram maiores escores em Ativação Motora em comparação com as meninos e as crianças AT, enquanto que os meninos PT apresentaram menores escores em Focalização da Atenção do que as meninas e as crianças AT. Com relação ao comportamento das crianças foi verificado que apenas na escala Problemas de Atenção houve diferença significativa entre os grupos; as crianças PT tiveram maiores escores do que as crianças AT nesta escala. Esses achados contribuem para compreender sobre o impacto dos riscos do nascimento prematuro no temperamento e comportamento das crianças, assim como o efeito diferencial do gênero. Esses devem ser considerados em programas preventivos de follow-up de prematuros.

ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE ESTRESSE PRECOCE EM PACIENTES PSIQUIÁTRICOS ADULTOS

Camila Maria Severi Martins

Orientador: Prof. Dr. Mário Francisco P. Juruena

Dissertação de Mestrado apresentada em 27/04/2012

Introdução: Evidências recentes indicam que situações de abandono, negligência, maus tratos são fatores de risco para desencadeamento de psicopatologias na vida adulta. Esta associação ocorre na medida em que eventos traumáticos, nas fases iniciais do desenvolvimento podem desencadear transtornos psiquiátricos graves e incapacitantes no adulto.

Objetivo: O presente estudo objetivou avaliar a associação entre a ocorrência e a gravidade do estresse precoce e o desencadeamento de transtornos psiquiátricos em pacientes adultos em seguimento no Hospital Dia (HD) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Metodologia: A amostra foi composta por 81 pacientes psiquiátricos avaliados através de Entrevista Clínica, de acordo com os critérios do DSM-IV, para confirmação diagnóstica, divididos em 2 grupos: 58 pacientes com presença de estresse precoce e 23 com ausência de estresse precoce. A presença de estresse precoce foi confirmada através da aplicação do Questionário Sobre Traumas na Infância (QUESI). Os pacientes também foram avaliados quanto à gravidade da sintomatologia psiquiátrica através do Inventário de Depressão de Beck (BDI), do Inventário de Ansiedade de Beck (BAI), da Escala de Desesperança de Beck (BHS), da Escala de Ideação Suicida de Beck (BSI), da Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HAD) e da Escala de Impulsividade de Barratt (BIS- 11). Resultados: Na amostra avaliada, 71.6% dos pacientes sofreram algum tipo grave de estresse precoce comparados a 28.4% dos pacientes que não sofreram. Considerando-se os subtipos de estresse precoce avaliados, os pacientes com história de trauma apresentaram escores maiores em todos os subtipos de estresse precoce em comparação aos pacientes sem história de abuso. A pontuação total do QUESI também foi significativamente diferente 66.05 vs. 34.78 ($p<0.001$) entre os grupos. A maioria dos pacientes avaliados ($n=35$; 60.4%) sofreu de 3 a 5 subtipos de estresse precoce. Os resultados indicam que o estresse precoce está associado principalmente com o desenvolvimento de transtornos de humor e também com o aumento da gravidade dos sintomas psiquiátricos, principalmente dos sintomas depressivos, sintomas de desesperança, de ideação suicida e de impulsividade. Com relação ao diagnóstico de eixo II, o estresse precoce está associado com o desenvolvimento de transtorno de personalidade ($p=0.03$). Pacientes com história de abuso emocional (OR: 5.2; 95% IC, 1.9-13.5), negligência emocional (OR: 4.02; 95% IC, 1.6-10.2) e negligência física (OR: 4.0; 95% IC, 1.6-10.1) apresentam um risco de 4 a 5 vezes maior de desenvolver transtorno de personalidade. Além disso, indivíduos que sofreram abuso físico (OR: 2.46; 95% IC; 0.89-6.78), abuso sexual (OR: 2.87; 95% IC; 0.86-9.57) e negligência física (OR: 2.50; 95% IC; 0.95-6.55) possuem de 2 a 3

vezes mais chances de cometer tentativas de suicídio. Nossos dados também demonstraram que entre os subtipos de estresse precoce, o abuso emocional foi associado ao desencadeamento de psicopatologias na vida adulta, principalmente nos transtornos depressivos e nas esquizofrenias. Além disso, pacientes com presença de abuso emocional, tiveram maior gravidade em todos os sintomas psiquiátricos, tais como: sintomas de depressão, desesperança, ideação suicida, ansiedade e impulsividade. Também foram encontradas correlações positivas entre impulsividade, ideação suicida e desesperança com os escores totais do QUESI.

Conclusões: Os dados apontam para a importância do estresse precoce como fator desencadeante de transtornos psiquiátricos, bem como indicam que a gravidade do estresse precoce está associada com a gravidade dos sintomas psiquiátricos. Dessa forma há necessidade de mais estudos para compreensão do mecanismo pelo qual o estresse precoce é um fator de risco para o desenvolvimento de psicopatologias futuras.

EFEITO DA MINOCICLINA SOBRE O FLUXO SANGÜÍNEO CEREBRAL EM PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA DE INÍCIO RECENTE

Cristiane Reberte de Marque

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Tese de Doutorado apresentada em 15/05/2012

Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da adição da minociclina sobre o fluxo sanguíneo cerebral de pacientes portadores de esquizofrenia de início recente em tratamento antipsicótico utilizando Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT - da sigla em inglês). Para tanto, participaram da pesquisa 24 pacientes, divididos em 2 grupos (minociclina e placebo). Os critérios de avaliação foram os resultados da medida de fluxo sanguíneo cerebral (SPECT), escores de escalas de avaliação clínica e de testes neuropsicológicos. Observou-se que o tratamento com a minociclina reduziu significativamente os sintomas positivos e negativos quando comparados ao placebo. Diminuição significativa na captação de ^{99m}Tc -ECD (etilcisteinato- dímero marcado com tecnécio 99) no grupo minociclina em relação à condição placebo foi evidenciada no giro hipocampal direito (área de Brodmann - BA30), giro frontal superior direito (BA11), giro órbito-frontal direito (BA11), giro frontal inferior direito (BA45), direito giro temporal inferior (BA37), giro órbito-frontal esquerdo (BA47) e giro temporal inferior esquerdo (BA20). O mecanismo exato de ação da minociclina ainda permanece incerto, podendo envolver diversas ações, incluindo efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e efeitos sobre as vias de sinalização intra-celular. A melhora nos sintomas positivos e negativos, simultaneamente com a perfusão reduzida nas referidas áreas cerebrais mencionadas, em comparação com placebo, pode ter sido mediado pela modulação da transmissão glutamatérgica após o tratamento com a minociclina. A minociclina mostrou-se eficaz na melhora dos sintomas em pacientes com esquizofrenia, e estes efeitos parecem estar relacionados com alterações de perfusão em regiões límbicas diretamente afetadas na esquizofrenia.

ESTUDO DUPLO-CEGO DOS EFEITOS DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO, UM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO, SOBRE OS SINTOMAS PSICOGÊNICOS INDUZIDOS POR DOSES SUBANESTÉSICAS DE (S) KETAMINA EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Tatiana Moreira Naves de Rezende

Orientador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak

Dissertação de Mestrado apresentada em 25/05/2012

Introdução: Apesar de inúmeros estudos, a etiologia e fisiopatologia da esquizofrenia permanecem desconhecidas. Diversos trabalhos têm apontado para um possível papel do NO (óxido nítrico) na esquizofrenia. NO é um gás de química única que influencia a liberação de neurotransmissores, o aprendizado, a memória e o neurodesenvolvimento. Estudos recentes que investigaram o papel do NO em pacientes com esquizofrenia, sugerem um possível prejuízo na neurotransmissão mediada pelo NO neste transtorno. No presente trabalho, nós examinamos os efeitos agudos da administração do nitroprussiato de sódio, um doador de NO, nos sintomas psicogênicos induzidos por doses subanestésicas de (s)-ketamina em indivíduos saudáveis, bem como investigamos o efeito dose-resposta da administração do nitroprussiato de sódio nestes voluntários.

Materiais e Métodos: 38 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, entre 18 e 45 anos, foram divididos em três grupos de 16, 11 e 11 sujeitos respectivamente, de acordo com a dose de nitroprussiato a ser administrada (0,15; 0,25 e 0,5 mcg/kg/min). Na primeira sessão os voluntários receberam ketamina e tiveram uma chance em duas em receber nitroprussiato de sódio e ou placebo. Já na segunda sessão o voluntário recebeu a substância não utilizada na primeira e ketamina.

Iniciou-se com aplicação dos testes cognitivos (FAS, N-back e Stroop), CADSS, BPRS e tarefas computadorizadas de reconhecimento emocional seguidos da infusão endovenosa de placebo ou nitroprussiato de sódio, durante 75 minutos. Logo após início da infusão de placebo ou nitroprussiato de sódio foi aplicada a BPRS. Após 10 minutos de início da infusão contínua de placebo ou nitroprussiato de sódio deu início a administração em bolus, durante um minuto, de (s)-ketamina (0,26mg/kg). Cinco minutos após o bolus, foi administrada a dose de manutenção de (s)-ketamina endovenosa de 0,25mg/kg/h, durante 50 minutos. Logo após a infusão em bolus da ketamina foram aplicadas as escalas BPRS e CADSS e após 15 minutos de início da infusão contínua da mesma droga foram aplicadas todas as escalas e testes propostos. E para finalizar o experimento foram aplicadas a CADSS e BPRS.

Resultados: A ketamina, foi bastante eficiente e segura nos propósitos de promover alterações do estado psicopatológico e interferir no desempenho das tarefas cognitivas dos voluntários, bem como o nitroprussiato de sódio foi eficaz e seguro em proteger o indivíduo dos efeitos psicogênicos induzidos pela ketamina. As alterações psicopatológicas induzidas pela ketamina e avaliadas pela escala BPRS foram significativamente menores durante a administração do nitroprussiato quando comparadas com placebo. Os escores da subescala objetiva da CADSS foram significativamente diminuídos nas sessões com nitroprussiato de sódio se comparado com as sessões placebo. Nos testes cognitivos não foram observadas diferenças significativas nos escores das duas sessões. Os testes que retratam a cognição social (tarefas computadorizadas para pareamento de expressão emocional e de identidade facial) foram significativos no sentido de evidenciar o efeito protetor do nitroprussiato de sódio.

Conclusão: A hipótese de que o nitroprussiato de sódio poderia ter efeito protetor nos sintomas psicogênicos induzidos por doses subanestésicas de ketamina em indivíduos saudáveis, foi corroborada. Já a segunda hipótese da existência de uma dose-resposta da administração do nitroprussiato de sódio nestes voluntários não foi atingida. Neste sentido, drogas atuando no sistema "NMDA-NOGMPc" talvez representem uma nova alternativa para o tratamento de pacientes com esquizofrenia. Todavia, vale lembrar que os achados descritos no presente estudo, apesar de animadores, ainda são preliminares, e necessitam ser reproduzidos em ensaios posteriores.

Saúde na Comunidade

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO DENGUE NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO PRETO - SP

Lígia Maria Amadio Domingues

Orientador: Prof.Dr. Antonio Ruffino Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 13/04/2012

O presente estudo descreve a ocorrência de dengue no município de Ribeirão Preto, entre 1998 e 2008, analisando sua distribuição espaço-temporal e possíveis variáveis relacionadas à sua ocorrência. Foram utilizados os dados de casos autóctones de dengue notificados à Secretaria de Saúde do município e as incidências de dengue foram calculadas nas diferentes escalas de tempo. A infestação vetorial foi analisada através do índice de Breteau. Foi analisada a influência da precipitação e temperatura na ocorrência de dengue e de seu vetor. A espacialização do dengue e seu vetor foi realizada de acordo com a divisão utilizada pela vigilância epidemiológica. Também foram analisadas as incidências de dengue entre os sexos e faixas etárias. Observou-se que os meses de fevereiro a maio são os que apresentaram o maior número de casos e os meses de menor ocorrência foram agosto e setembro, sendo a sazonalidade da doença melhor representada utilizando-se períodos compreendidos entre setembro do primeiro ano e agosto do ano seguinte. O número de casos variou de 33, entre os anos de 2003 e 2004, a 6.155 entre os anos de 2005 e 2006. O período estudado pode ser dividido em dois grupos: anos endêmicos, de 1998 a 2000, de 2001 a 2005 e entre 2007 e 2008; e anos epidêmicos, entre 2000 e 2001, e entre 2005 e 2007. Verificou-se que os meses de julho e agosto foram os que apresentaram menores índices de infestação, enquanto que os meses de dezembro e janeiro apresentaram os maiores índices. Em média, 13% dos recipientes positivos encontrados eram vasos de planta, 19% de pratos para vasos de planta, e 23% de outros tipos de recipientes não classificados. O aumento das temperaturas e precipitações resultou no aumento da infestação vetorial, que por sua vez levou ao aumento na ocorrência de dengue. Os dados indicam correlação mais forte entre tais variáveis quando considerado um intervalo de 1 a 4 meses entre as mesmas. Em 2004 ocorreram poucos casos no município, enquanto de 2005 a 2007 a doença se espalhou por quase toda a cidade. Também foram encontradas larvas do vetor em todas as regiões e meses avaliados. A maior incidência de dengue ocorreu entre 30 e 59 anos de idade e a menor ocorreu entre as crianças menores de 9 anos e adultos com 80 anos ou mais. A incidência foi ligeiramente maior no sexo feminino. Assim, este trabalho poderá servir como subsídio para o combate ao vetor e o controle da doença.

A ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA E AS INTERNAÇÕES POR CONDIÇÕES SENSÍVEIS À ATENÇÃO PRIMÁRIA

Amanda Cristina Alcantara Verceze Scarpellini

Orientador: Prof. Dr. Amaury Lelis Dal-Fabbro

Dissertação de Mestrado apresentada em 20/04/2012

O presente estudo avalia a sobrecarga de cuidadores primários de crianças com paralisia cerebral, caracterizando a população estudada e as variáveis que possam estar associadas com o aumento da sobrecarga dos cuidadores. Embora a criança com paralisia cerebral necessite de intenso suporte, os cuidados recaem sobre um membro da família que não está preparado para exercer a tarefa de cuidar. Este estudo contou com a participação de 31 cuidadores de crianças com paralisia cerebral com diferentes níveis de comprometimento motor, acompanhadas no Centro de Reabilitação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP; crianças de ambos os sexos e idades entre 2 e 8 anos. Todos os cuidadores convidados aceitaram o convite em participar da pesquisa. Nesta amostra os cuidadores foram mães, tias e avós. Em apenas um dia os participantes respondiam às escalas: Inventário de Avaliação Pediátrica de Incapacidade (PEDI) com roteiro semiestruturado acrescido de idade do cuidador e número de moradores no domicílio e Escala de Sobrecarga do Cuidador de Zarit (Burden Interview); além disso, a criança era classificada de acordo com seu comprometimento motor grosso pelo Sistema de Classificação da Função Motora Grossa (GMFCS). Os dados da entrevista foram relacionados àqueles obtidos pelos instrumentos, no sentido de verificar possíveis associações entre a percepção de sobrecarga por parte do cuidador e variáveis centradas na criança e características próprias do cuidador. Constatou-se que todos os cuidadores eram do sexo feminino, a grande maioria eram as próprias mães sendo que a maior parte delas não trabalhava fora de casa. Desta forma a figura feminina deixa de lado a sua vida social e profissional para cuidar de sua criança. A média de sobrecarga foi classificada como moderada e não se encontrou associações significativas entre as variáveis. Os resultados podem mostrar a dificuldade das mães em reconhecer e assumir suas percepções de sobrecarga para cuidar dos problemas de sua criança.

INSEGURANÇA ALIMENTAR DOMICILIAR E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS DE CRECHES MUNICIPAIS DE RIBEIRÃO PRETO

Ana Paula Lara Michelin Sanches

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Saes Sartorelli

Dissertação de Mestrado apresentada em 28/05/2012

Segurança Alimentar e Nutricional que é a garantia, a todos, de condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer outras necessidades essenciais, e o desrespeitado a este direito indica a insegurança alimentar. Para caracterizar a situação de insegurança alimentar das famílias e o estado nutricional de crianças menores de 5 anos de idade de creches no município de Ribeirão Preto-SP desenvolveu-se um estudo transversal e descritivo, com 344 crianças e suas famílias. A segurança alimentar das famílias foi avaliada com a Escala Brasileira de Segurança Alimentar e Nutricional (EBIA) e as famílias classificadas em situação de Segurança Alimentar (SA) e Insegurança Alimentar Leve (IAL), Moderada (IAM) e Grave (IAG). Aplicou-se uma entrevista com os pais para coleta de variáveis sócio-econômicas e demográficas com um questionário estruturado. A antropometria foi realizada nas creches e os índices Peso/Idade (P/I), Peso/Estatura (P/E), Estatura/Idade (E/I) e IMC/Idade (IMC/I) calculados segundo padrão da Organização Mundial da Saúde (2006). Para a classificação do estado nutricional adotou-se os pontos de corte do SISVAN (Ministério da Saúde). Foram calculadas medidas de prevalências e verificou-se associação entre as variáveis do estudo pelo teste qui-quadrado. Identificou-se que a SA estava presente em 45,7% das famílias, enquanto que a IAL, IAM e IAG foram encontradas em 42,4%, 7,85% e 4,07% das famílias, respectivamente. A análise dos dados sócio-econômicos apontou maior proporção de mães com ensino fundamental e de pais que não moram com a família entre aquelas com IA. Verificou-se proporção maior de residência inacabada, menor número de cômodos, maior número de moradores no domicílio, vínculo com programas sociais e menor renda per capita entre as famílias em situação de IA ($p < 0,05$). Não se observou diferenças entre as prevalências de desvios nutricionais e a condição de SA das famílias. Entretanto, observou-se prevalência de 9,3% de baixa estatura, 2,3% de baixo peso pelo índice no P/I e 1,5% de magreza segundo P/E e IMC/I. O excesso de peso segundo P/I foi encontrado em 11,0% das crianças. Os índices IMC/I e P/E indicaram prevalências de 8,7% e 7,3% de crianças acima de +2 escoreZ, 2,9% e 2,3% acima de +3 escoreZ, respectivamen-

te. A situação de insegurança alimentar é prevalente na população estudada, sobretudo entre as famílias com pior condição socioeconômica. Foi observado que o excesso de peso é o principal problema nutricional nesta população infantil. Novos estudos são necessários para o melhor conhecimento das características que condicionam a insegurança alimentar e o estado nutricional desta população visando a elaboração de estratégias de enfrentamento desta situação.

FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM ADOLESCENTES ESTUDANTES DA REDE PÚBLICA DE ENSINO DE BRODOWSKI-SP

Valdelice Maria Gonçalves

Orientador: Prof.Dr. Laércio Joel Franco

Dissertação de Mestrado apresentada em 01/06/2012

Introdução: As alterações metabólicas associadas ao sistema cardiovascular, em especial a doença arterial coronariana (DAC) secundária à aterosclerose, constituem as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. De forma semelhante ao que ocorre em adultos, os fatores de risco cardiovascular estão presentes em crianças e adolescentes como a obesidade, a obesidade abdominal e a hipertensão arterial. **Objetivo:** Estudar a presença de algumas variáveis consideradas fatores de risco cardiovascular em adolescentes, matriculados em rede pública de ensino de Brodowski-SP. **Metodologia:** Foi realizado um estudo transversal com 668 escolares de 10 a 16 anos da rede pública municipal de ensino de Brodowski-SP. Dados de antropometria foram coletados (peso, altura e circunferência da cintura). Os adolescentes foram avaliados de acordo com seu estado nutricional segundo os escores IMC para a idade, a composição corporal foi avaliada pela bioimpedância, a pressão arterial foi avaliada por aparelho automático. Os dados foram analisados por meio do Teste Exato de Fisher e Regressão Logística (Odds Ratio Bruto e Ajustada). **Resultados:** A faixa etária predominante foi de 11 a 13 anos de idade. Os dados sobre sobrepeso e obesidade foram alarmantes e perfazem um total de 32,3% de adolescentes com excesso de peso, sendo 22,6% dos adolescentes com sobrepeso e 9,7% com obesidade. Dos alunos avaliados, 26 (3,9%) foram classificados como hipertensos e 116 (17,4%) como pré-hipertensos; no total foram encontrados 142 (21,3%) escolares com pressão arterial elevada. O excesso de gordura corporal pela bioimpedância foi evidenciado em 26,6% dos escolares e 20,7% dos escolares apresentaram obesidade abdominal. O modelo de regressão logística (Odds Ratio ajustada) mostrou significativa associação entre a faixa etária (alunos entre 14 a 16 anos), presença de obesidade abdominal, presença de excesso de peso, escolaridade materna com a alteração da pressão arterial. **Conclusão:** As prevalências encontradas de excesso de peso, pressão arterial alterada, excesso de gordura corporal e obesidade abdominal foram relevantes na população estudada, e associação entre pressão arterial elevada e indicadores de adiposidade foram evidenciadas. São necessárias dessa forma intervenções que tenham por objetivo o controle e prevenção dessas condições consideradas fatores de risco cardiovascular.

INTEGRAÇÃO INFORMAÇÕES E ANÁLISE PARA PACIENTES VÍTIMA DE TRAUMA NA UNIDADE DE EMERGÊNCIA DO HCFMRP

Eduardo Alexandre Gula

Orientador: Prof. Dr. Domingos Alves

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2012

Integração de informações e análise epidemiológica para pacientes vítimas de trauma na Unidade de Emergência do HCFMRP. Desde 1980 observa-se um crescente registro de ocorrências de causas externas no Brasil, que passaram a ocupar o segundo lugar dentre as causas de morte em grandes centros urbanos, superando as neoplasias. Foram analisados os dados de pacientes vítimas de trauma com internação na Unidade de Emergência do HCFMRP, em Ribeirão Preto (SP) entre 2006 e 2009. Foi realizada uma análise descritiva, envolvendo informações sobre o evento traumático, índices de gravidade RTS, ISS e TRISS, provenientes do software IntegraVep, de uso do Núcleo Hospitalar de Epidemiologia do HCFMRP, além de quantificações de exames laboratoriais e radiológicos demandados aos referidos pacientes, com o intuito de analisar as características e evolução dos pacientes. Foi possível observar a alta quantia de exames radiológicos e laboratoriais solicitados para pacientes com lesões leves além da distribuição dos pacientes quanto a faixa etária, sexo, mecanismos de trauma e gravidade de lesão. A utilização de um software específico para análise dos dados existentes no banco de dados do HCRP se mostrou adequada ao ser usado para os pacientes vítimas de trauma, podendo ser expandido para os demais setores do hospital.

AVALIAÇÃO DA CONFIABILIDADE DO QUESTIONÁRIO PARA DIAGNÓSTICO COMPARTILHADO DA ATENÇÃO BÁSICA EM UNIDADES DE SAÚDE DA FAMÍLIA DE RIBEIRÃO PRETO - SP

Fábio Franchi Quagliato

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ruffino Netto

Dissertação de Mestrado apresentada em 04/06/2012

A Estratégia de Saúde da Família (ESF) é um modelo de organização dos serviços de Atenção Básica à Saúde peculiar do Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS), baseado em equipes multiprofissionais. O desenvolvimento de métodos de avaliação do funcionamento das equipes de Saúde da Família ajudaria a caracterizar tanto o potencial como as contribuições reais dos trabalhadores e facilitaria a avaliação da efetividade e eficiência dos serviços. O "Questionário para Diagnóstico Compartilhado" é um instrumento utilizado para apoiar a equipe na realização de um diagnóstico ampliado do contexto sanitário em que está inserida e de sua capacidade de intervenção, por meio da cogestão e da autoavaliação. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a confiabilidade do Questionário para Diagnóstico Compartilhado. Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo, comparação de métodos diagnósticos. O questionário foi aplicado por dois entrevistadores nas Unidades de Saúde da Família de Ribeirão Preto (SP) que concordaram em participar do projeto. Após a aplicação, utilizando-se o coeficiente Kappa, a concordância das respostas obtidas pelos entrevistadores foi avaliada. Foram entrevistadas 20 equipes de Saúde da Família, totalizando 151 profissionais ligados à estratégia. Todas as questões com respostas categóricas apresentaram Kappa simples e Kappa ponderado acima de 0,8, exceto a questão 68, à qual nenhum profissional respondeu. Todas as questões dicotômicas apresentaram concordância entre as respostas dos entrevistadores. Com relação às questões abertas, houve concordância entre as respostas dos entrevistadores em todas as questões, apresentando o mesmo conteúdo. Os resultados encontrados indicam uma concordância quase perfeita entre os entrevistadores, revelando a alta confiabilidade do questionário. O questionário apresentou adequada confiabilidade, porém é necessário avaliar a sua validade e reprodutibilidade. A análise das respostas permitiu caracterizar alguns obstáculos enfrentados pelas equipes de Saúde da Família de Ribeirão Preto, como a demanda excessiva, estrutura urbana com poucos recursos e potencialidades, falta de infra-estrutura das unidades e falta de conhecimento dos profissionais quanto ao financiamento.

PREDIÇÃO DO NÚMERO MENSAL DE CASOS DE DENGUE POR MODELOS DE SÉRIES TEMPORAIS

Elisângela Aparecida da Silva Lizzi

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada em 22/06/2012

Introdução: A dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus relatada em regiões tropicais e subtropicais. Os maiores números de casos costumam ocorrer nos períodos quentes e chuvosos do ano, que favorecem as condições para o desenvolvimento do vetor da doença, o mosquito *Aedes aegypti*. Modelos estatísticos podem ser úteis para a compreensão das variações mensais dos números de casos registrados da doença e podem trazer razoáveis previsões dos números mensais de casos em um período subsequente a uma série temporal estudada.

Métodos: Esta dissertação trata de um estudo ecológico com componente de série temporal. Foram usados registros mensais de casos confirmados de dengue, entre os anos de 1998 a 2008, obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de dois municípios do interior paulista (Ribeirão Preto e Campinas). Modelos estatísticos de séries temporais foram utilizados para descrever o comportamento das séries de dados e prever o número esperado de casos da doença em um período subsequente. Utilizou-se modelos de Box & Jenkins, ou seja, o modelo SARIMA (Seasonal Autoregressive Integrated Moving Average) com extensões (modelo SARIMAX) que permitem incorporar covariáveis como as temperaturas máxima, média e mínima e a precipitação média a cada mês. Utilizou-se o critério de Akaike (AIC) para a comparação entre diferentes especificações dos modelos. A partir dos modelos ajustados aos dados, foram obtidas previsões mensais para o ano de 2009, sendo estas comparadas com os valores observados.

Resultados: Sem considerar a inclusão de covariáveis, o melhor modelo para os dados de Campinas foi o SARIMA(2,1,2)(1,1,1)₁₂, e para os dados de Ribeirão Preto o melhor foi o SARIMA(2,1,3)(1,1,1)₁₂ (modelos com menores valores de AIC). Ao incorporar nos modelos as variáveis climáticas, observou-se um melhor ajuste para o município de Campinas, o modelo SARIMAX(1,1,1)(1,1,1)₁₂ que inclui a precipitação observada nos 2 meses antecedentes às ocorrências mensais de casos de dengue e a temperatura mínima registrada nos 3 meses antecedentes. No município de Ribeirão

Preto, o modelo que mostrou-se mais adequado aos dados foi o SARIMAX(1,1,1)(0,1,1)₁₂ que inclui precipitação observada nos 3 meses antecedentes às ocorrências mensais de casos de dengue e a temperatura mínima registrada em um mês anterior. As previsões mensais obtidas para o ano de 2009 mostraram-se razoavelmente próximas às aquelas observadas, em ambos municípios.

Conclusões: Os resultados do presente estudo, em adição a resultados da literatura, evidenciam que os números de componentes autorregressivos e de média móvel adequados ao ajustes de modelos SARIMA variam de uma população a outra, sugerindo diferentes padrões temporais da doença de acordo com características locais. Comparações entre valores preditos e observados sugerem que os modelos SARIMA são ferramentas úteis para predição do número de casos de dengue. Sugere-se que os modelos utilizados nesta dissertação sejam utilizados por serviços municipais de saúde para a vigilância da doença, o que pode trazer benefícios em programas de prevenção e planejamentos de serviços públicos.